

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE**

**XXII CICLO**

**SSD: MED/04**

***Alma Mater Studiorum – Università di Bologna***

**Citotossicità e traffico intracellulare di  
“*ribosome-inactivating proteins*” vegetali  
mono e bcatenarie**

**Dott.ssa Vittoria Scicchitano**

Coordinatore:

**Chiar.ma Prof.ssa**

**Marialuisa Zerbini**

Tutore:

**Chiar.ma Prof.ssa**

**Maria Giulia Battelli**

---

**DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA SPERIMENTALE**

---

Esame finale anno 2010

# **INDICE**

<b>CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE</b>	<b>6</b>
<b>Note introduttive sulle <i>ribosome-inactivating proteins</i></b>	<b>6</b>
<b>1.1 Caratteristiche generali</b>	<b>8</b>
<i>Classificazione e struttura generale delle RIP</i>	8
<i>Caratteristiche chimico-fisiche</i>	8
<i>Distribuzione in natura</i>	11
<i>Altri inibitori della sintesi proteica presenti in natura</i>	12
<i>Struttura tridimensionale</i>	13
<i>Biosintesi e modificazione post-traduzionali</i>	15
<b>1.2 Attività enzimatica</b>	<b>18</b>
<i>Attività RNA N-Glicosidasi a carico dei ribosomi</i>	19
<i>Attività polinucleotide:adenosina glicosilasi (PNAG)</i>	20
<i>Attività polinucleotide:guanosina glicosilasi</i>	21
<b>1.3 Citotossicità</b>	<b>22</b>
<i>Interazione delle RIP con le cellule</i>	22
<i>Routing intracellulare delle RIP</i>	25
<i>RIP e apoptosi</i>	28
<b>1.4 Attività biologiche</b>	<b>31</b>
<i>Attività antitumorale (immunotossine)</i>	31
<i>Attività antivirale (HIV), antifungina e insetticida</i>	32
<i>Immunogenicità, allergenicità, immunosoppressione</i>	33
<i>Attività abortiva</i>	34
<i>Attività trasformante</i>	34
<i>Trasporto assonale delle RIP</i>	35
<i>Ruolo in natura</i>	36
<b>1.5 Tossicità delle RIP sull'uomo e sugli animali</b>	<b>36</b>
<b>1.6 Applicazioni delle RIP</b>	<b>37</b>
<i>Impiego in agricoltura</i>	37
<i>Impiego in terapia: le immunotossine</i>	38
<b>1.7 Ricina e altre RIP come armi biologiche</b>	<b>40</b>
<b>1.8 Impieghi delle immunotossine</b>	<b>40</b>
<i>Le neoplasie</i>	40
<i>I trapianti</i>	41
<i>Le malattie autoimmuni</i>	42
<i>Infezioni virali</i>	42
<i>Immunotossine anti-ACHR</i>	43
<b>1.9 Conclusioni e prospettive future</b>	<b>44</b>

<b>CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>46</b>
<b>CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI</b>	<b>51</b>
<b>3.1 MATERIALI</b>	<b>52</b>
3.1.1 RIP	52
3.1.2 Colture cellulari	52
3.1.3 Anticorpi	53
3.1.4 Kit	53
3.1.5 Reattivi	54
3.1.6 Strumenti	54
<b>3.2 METODI</b>	<b>56</b>
3.2.1 Inibizione della sintesi proteica su lisato di reticolociti di coniglio	56
3.2.2 Colture cellulari	57
3.2.3 Esperimenti basati sull'inibizione della sintesi proteica cellulare	57
3.2.4 Esperimenti di microscopia a fluorescenza	58
<i>Trattamento delle cellule e intossicazione con saporina</i>	58
<i>Marcatura del Golgi e del RER e colocalizzazione della saporina</i>	59
<i>Saggio endonucleasi IV</i>	60
<b>3.2.5 Esperimenti di microscopia elettronica</b>	<b>61</b>
<i>Determinazione delle condizioni ottimali per la coniugazione della saporina all'oro</i>	61
<i>Preparazione del coniugato oro-saporina</i>	62
<i>Intossicazione cellulare con il coniugato saporina-oro (metodo diretto)</i>	63
<i>Intossicazione cellulare con saporina non coniugata (metodo indiretto)</i>	64
<i>Preparazione dei campioni per la microscopia elettronica</i>	64
3.2.6 Esperimenti basati sul saggio di vitalità cellulare	67
3.2.7 Valutazione dell'apoptosi mediante misurazione delle caspasi 3/7	68
3.2.8 Determinazione di <i>binding</i> , <i>uptake</i> ed esocitosi cellulare di lanceolina e stenodactilina	69
<b>CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONI - STUDI SULLA SAPORINA</b>	<b>71</b>
4.1 Inibizione della sintesi proteica cellulare	72
4.2 Distribuzione intracellulare della saporina mediante Immunofluorescenza	74
4.3 Traffico intracellulare della saporina valutato mediante microscopia elettronica - metodo diretto	78

4.3.1 Endocitosi e successive fasi del routing	79
<b>4.4 Traffico intracellulare della saporina valutato mediante microscopia elettronica – metodo indiretto</b>	<b>83</b>
4.4.1 Endocitosi e fasi del routing	83
 <b>CAPITOLO 5 – RISULTATI E DISCUSSIONI - STUDI SU LANCEOLINA E STENODACTILINA</b>	 <b>87</b>
<b>5.1 Proprietà enzimatiche di lanceolina e stenodactilina: effetti sulla sintesi proteica</b>	<b>88</b>
<b>5.2 Valutazione degli effetti citotossici delle RIP: inibizione della sintesi proteica e della vitalità in cellule HeLa</b>	<b>90</b>
<b>5.3 Proprietà apoptotiche di lanceolina e stenodactilina</b>	<b>93</b>
<b>5.4 Interazione con le cellule e <i>turnover</i> intracellulare di lanceolina e stenodactilina</b>	<b>95</b>
5.4.1 Endocitosi e routing intracellulare	95
5.4.2 Binding cellulare	97
5.4.2.1 Efficacia di binding	99
5.4.3 Uptake cellulare	100
5.4.4 Esocitosi ed attività residua	102
<b>5.5 Resistenza alla degradazione proteasomale e proteolitica</b>	<b>104</b>
 <b>CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI</b>	 <b>106</b>
 <b>CAPITOLO 7 – BIBLIOGRAFIA</b>	 <b>110</b>

## ABBREVIAZIONI

<b>α2M</b>	Alfa 2-macroglobulina;	<b>PNAG</b>	<i>polinucleotide:adenosina glicosidasica</i> ;
<b>α2MR</b>	Recettore per l'α2M;	<b>PAP-S</b>	<i>Pokeewed antiviral protein from seeds</i> ;
<b>AIDS</b>	Sindrome da immunodeficienza acquisita;	<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> (soluzione fisiologica tamponata);
<b>AOP-1</b>	Proteina anti-ossidante-1;	<b>PEG</b>	<i>Poli-etilenglicole</i> ;
<b>ATP</b>	Adenosina trifostato	<b>pl</b>	Punto isoelettrico;
<b>BFA</b>	Brefeldina A	<b>PNAG</b>	Attività polinucleotide adenosin glicosidasica;
<b>BiP</b>	Binding Protein;	<b>RCA</b>	Agglutinina del ricino;
<b>BSA</b>	Bovin serum albumin;	<b>RER</b>	Reticolo endoplasmatico rugoso;
<b>dgA</b>	<i>Deglycosylated ricin A-chain</i> (catena A della ricina deglicosilata);	<b>RIP</b>	Ribosome-inactivating protein;
<b>DNA</b>	Acido Desossiribonucleico;	<b>RNA</b>	Acido Ribonucleico;
<b>EDTA</b>	Acido etilendiamminicotetracetico;	<b>rRNA</b>	RNA ribosomiale;
<b>EE</b>	Endosomi precoci;	<b>ROS</b>	Specie reattive dell'ossigeno;
<b>EF-2</b>	Fattore di allungamento 2;	<b>RPMI</b>	Mezzo di coltura sintetico del Roswell Park Memorial Institute;
<b>ER</b>	Reticolo endoplasmatico;	<b>RTA</b>	<i>Ricin toxin A-chain</i> (catena A della ricina);
<b>FBS</b>	Siero bovino fetale;	<b>SDS</b>	Sodio dodecil-solfato;
<b>FITC</b>	<i>Fluoresceine-isothiocyanate conjugate</i> (coniugato con fluoresceina isotiocianato);	<b>SO-S6</b>	Saporina-S6;
<b>HIV</b>	<i>Human immunodeficiency virus</i> (virus dell'immunodeficienza umana);	<b>TCA</b>	Acido tricloroacetico;
<b>HPLC</b>	Cromatografia liquida ad alta pressione;	<b>TMV</b>	Virus del mosaico del tabacco;
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentrazione che determina il 50% di inibizione rispetto ai controlli;	<b>TNG</b>	<i>Trans-Golgi Network</i> ;
<b>Ig</b>	Immunoglobulina;	<b>tRNA</b>	RNA transfer;
<b>LE</b>	Endosomi maturi;	<b>VLS</b>	<i>Vascular leak syndrome</i> (sindrome da aumentata permeabilità vascolare).
<b>Lp</b>	Lisosomi;	<b>GVHD</b>	Graft versus host disease;
<b>kDa</b>	Chilo Dalton;		
<b>PAP</b>	<i>Pokeewed antiviral protein</i> ;		

# **Capitolo 1**

## **Introduzione**

## RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS

### NOTE INTRODUTTIVE

Le “*ribosome-inactivating proteins*” sono proteine, per la maggior parte di origine vegetale e alcune di origine batterica, in grado di bloccare la sintesi proteica, uno dei più importanti processi cellulari di sintesi macromolecolare insieme alla replicazione del DNA.

L'identificazione di queste proteine ha inizio nel 1884, quando Warden e Waddel scoprono la natura proteica della tossina contenuta nei semi di *Abrus precatorius*, alla quale è stato dato il nome di abrina. Qualche anno dopo, nel 1887, Dixon compiendo i primi studi sul *Ricinus communis*, la cui tossicità era allora già nota, suppone che il principio tossico del ricino fosse una proteina (Dixon, 1887). In seguito, questa proteina è stata purificata da Herman Stillmark, che propose per essa il nome di ricina, attribuendone la tossicità alla capacità di agglutinare gli eritrociti (Stillmark, 1888).

Un contributo molto importante nello studio di queste due tossine si deve a Paul Ehrlich, che somministrando piccole quantità di tossina tramite iniezione sottocutanea, riuscì ad ottenere l'immunizzazione degli animali trattati (Ehrlich, 1891). Questi studi portarono alla luce alcune caratteristiche dell'immunità adattativa, tra cui la specificità della risposta difensiva. Infatti, un animale immunizzato contro la ricina risultava immune alla sua somministrazione, ma era ancora sensibile alla tossicità dell'abrina e viceversa (vedi rassegna Olsnes 2004).

Gli studi su abrina e ricina hanno segnato il punto di partenza per l'identificazione di molte altre proteine vegetali con caratteristiche strutturali e funzionali simili. Un significativo passo in avanti verso uno studio più approfondito di queste proteine è stato compiuto nel 1970, quando Lin e collaboratori hanno scoperto che ricina e abrina sono più tossiche per le cellule tumorali che su quelle normali (Lin *et al.*, 1970). Questa scoperta ha dato il via a numerosi studi sulle caratteristiche di queste proteine, sulla loro diffusione e sulle loro numerose attività biologiche. Già dal 1973 è stata individuata la loro

capacità di danneggiare irreversibilmente i ribosomi (Montanaro *et al.*, 1973) e in particolare la subunità maggiore (Sperti *et al.*, 1973). La denominazione di *ribosome-inactivating protein* (RIP) è stata introdotta solo nel 1982 da Stirpe, per indicare tutto quel gruppo di proteine che inattivano irreversibilmente i ribosomi. Successivamente è stato chiarito il meccanismo d'azione delle RIP sui ribosomi anche a livello molecolare (Endo *et al.*, 1987). Negli anni '90 è stata scoperta la capacità delle RIP di depurinare diversi substrati adenosilici come altri tipi di RNA, DNA e poli (A), ma non ATP o dATP (Barbieri *et al.*, 1997).



## 1.1 CARATTERISTICHE GENERALI

### CLASSIFICAZIONE E STRUTTURA GENERALE DELLE RIP

Dal punto di vista strutturale le RIP sono distinte in due gruppi: RIP di tipo 1 o monocatinarie e RIP di tipo 2 o bicatinarie (figura 1). Le similitudini riscontrate negli studi genetici e di struttura sembrano suggerire che entrambe le categorie derivano da un comune precursore ancestrale e che quindi le RIP di tipo 2 si siano evolute da quelle di tipo 1 (Ready *et al.*, 1984).

### CLASSIFICAZIONE E STRUTTURA GENERALE DELLE RIP

#### RIP tipo 1

##### STRUTTURA GENERALE



##### ECCEZIONI



#### RIP tipo 2



S  
I  
S



Dominio N-glicosilico



Dominio sconosciuto



Dominio lectinico



Siti di legame per i carboidrati

#### Esempio

Saporina

JIP60

Maize b-32

Ricina

**Figura 1:** Rappresentazione schematica delle RIP.

Le **RIP di tipo 1 o monocatinarie** tra cui la saporina (estratta dalla *Saponaria officinalis*), sono enzimi monomerici, con un peso molecolare di circa 30 KDa. Sono proteine basiche, che mostrano un'elevata omologia di sequenza e di struttura secondaria riguardo il loro sito attivo, ma sono significativamente differenti per sequenza complessiva e modificazioni post-traduzionali. Queste RIP (figura 1), essendo sprovviste di catena lectinica, non sono in grado di

legarsi alla superficie cellulare e risultano meno tossiche sia per le cellule in coltura che per gli animali, rispetto alle RIP bicatenarie ad elevata tossicità. Tuttavia le RIP monocatenarie hanno ugualmente un'efficacia alta nell'inibizione della sintesi proteica in sistemi *cell-free* (vedi rassegna Barbieri *et al.*, 1993).

Possono venire classificate tra le RIP di tipo 1 anche alcuni esempi atipici di RIP (figura 1). Queste RIP sono sintetizzate come precursori inattivi (proRIPs) (Dixon, 1887) e richiedono un processo di maturazione di tipo proteolitico (Mundy *et al.*, 1994). Fino ad ora sono state caratterizzate RIP di questo tipo soltanto nell'orzo (Reimbothe *et al.*, 1994; Chaudhry *et al.*, 1994) e nel mais (Walsh *et al.*, 1991; Bass *et al.*, 1992). La b-32 del mais è una proteina acida resa attiva da un taglio che rimuove un segmento peptidico interno e lascia due subunità di 16.5 ( $\alpha$ ) e 8.5 ( $\beta$ ) kDa associate tra loro da legami non covalenti. Un altro esempio è dato dalla JIP60, una proteina di 60 kDa identificata nell'orzo (*Hordeum vulgare*), che consiste di un dominio amino-terminale, somigliante alle RIP di tipo 1, legato ad un dominio carbossi-terminale non correlato, con funzione sconosciuta (Reimbothe *et al.*, 1994). Anche in questo caso, l'attivazione avviene per opera di un taglio proteolitico che elimina il dominio carbossi-terminale e rende la proteina simile per carica e attività enzimatica alle RIP di tipo 1 (Chaudhry *et al.*, 1994).

Questo tipo di classificazione delle RIP atipiche non è tuttavia accettata universalmente dal mondo scientifico. Infatti, alcuni Autori hanno proposto di creare un terzo gruppo di RIP in cui classificare la proteina JIP60, mentre sono d'accordo nel considerare le RIP del mais e loro simili come RIP di tipo 1 a doppia catena (vedi rassegna Peumans *et al.*, 2001, Van Damme *et al.*, 2001).

**Le RIP di tipo 2 o bicatenarie** (tabella 2) sono costituite da due tipi di subunità, definite catena A e catena B (figura 1), unite tra loro da un ponte disolfuro e/o da legami non covalenti. A questa categoria appartengono sia potentissime citotossine, tra cui la ricina, sia un gruppo di RIP che pur possedendo la catena lectinica, non presentano una forte attività citotossica.

La catena A (attiva) e B (di legame), entrambe con peso molecolare di circa 30 KDa, sono responsabili rispettivamente dell'azione enzimatica sui ribosomi e

dell'endocitosi della tossina (Olsnes, 1978; Eiklid *et al.*, 1980), grazie alle proprietà lectiniche della catena. In seguito all'internalizzazione, affinché la catena A possa raggiungere i ribosomi, è necessaria la rottura del legame disolfuro che la lega alla catena B (vedi rassegna Nicolson, 1974; Sandvig *et al.*, 1978). Questa separazione è svolta da enzimi tio-disolfuro ossido riduttasi (Battelli *et al.*, 1984); mediante questa riduzione il sito attivo della subunità A, stericamente impedito dalla catena B nella molecola intera, viene reso accessibile all'interazione con il substrato (vedi rassegna Barbieri *et al.*, 1993).

Come precedentemente accennato, alle RIP di tipo 2 appartengono anche proteine poco tossiche. La maggior parte di queste RIP (tra cui l'ebulina, la nigrina, la sieboldina-b e l'agglutinina del ricino) mostra una tossicità per le cellule e per gli animali dello stesso ordine di grandezza delle RIP monocatenarie (cioè  $10^4$ - $10^6$  volte inferiore alle RIP bicatenarie tossiche). Le RIP di tipo 2, sia molto che poco tossiche risultano efficaci nell'inibire la sintesi proteica in sistemi acellulari, perlopiù esclusivamente dopo riduzione delle due catene (vedi rassegna Barbieri *et al.*, 1993). Un altro gruppo di RIP bicatenarie (come le lectine del sambuco SNA e SSA) presenta una scarsa attività sia *in vitro* che *in vivo* (Kaku *et al.*, 1996; Van Damme *et al.*, 1996). Queste differenze di tossicità tra le RIP di tipo 2 potrebbero essere dovute a difficoltà nel legare la membrana cellulare o dipendere dal tipo di *routing* intracellulare, come accade per la nigrina b (Battelli *et al.*, 1997) che rimanendo intrappolata nei lisosomi, non riesce a raggiungere il suo substrato cellulare.

## CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Le caratteristiche chimico-fisiche delle tossine vegetali sono piuttosto costanti, soprattutto nell'ambito delle RIP di tipo 1. Esse presentano un punto isoelettrico invariabilmente basico, maggiore di 9, mentre le catene A delle RIP di tipo 2 ha un punto isoelettrico che può andare da 4,6 (abrina) a 7,8 (agglutinina del ricino, RCA).

Tranne alcune eccezioni includenti la proteina della fitolacca americana (PAP), la saporina, e la catena A dell'abrina, la maggior parte delle RIP sono glicoproteine,

con un contenuto in carboidrati che varia dall'1,2% al 7,2% del peso totale (Barbieri *et al.*, 1982 (a), 1983; Olsnes e Pihl, 1977; Stirpe *et al.*, 1983, 1985, 1986). Gli zuccheri generalmente presenti sono glucoso, galattoso, mannosio, fucoso, xiloso e *N*-acetil-glucosamina. La componente glicidica non sembra avere un ruolo importante nell'azione enzimatica delle RIP, come dimostrato dall'osservazione che: i) alcune RIP tra le più attive non sono glicosilate, ii) la composizione glicidica varia in quantità e qualità per le diverse RIP, iii) le RIP ricombinanti prodotte da *E. Coli*, pur non essendo glicosilate, inibiscono la sintesi proteica in sistemi acellulari a livelli molto simili a quelli delle corrispondenti RIP native.

La glicosilazione sembra giocare un ruolo importante nella citotossicità di alcune RIP, soprattutto favorendo l'endocitosi cellulare. Infatti, in alcuni tipi di cellule, come per esempio quelle di derivazione macrofagica, avviene un'interazione tra i residui di mannosio terminali sulle RIP e i recettori per il mannosio sulle cellule. Alla presenza di questa ulteriore via di endocitosi è stata attribuita la responsabilità della maggiore sensibilità di queste cellule all'azione citotossica delle RIP (Riccobono e Fiani, 1996).

Sia le RIP di tipo 1 che la catena A delle RIP di tipo 2 presentano analogie nella composizione aminoacidica e nella struttura secondaria, con omologie che vanno dal 17 al 75%. All'interno della stessa pianta possono esistere forme molto simili di RIP (isoforme) con notevoli analogie di sequenza, soprattutto nella regione aminotermine (Butterworth e Lord, 1983).

## **DISTRIBUZIONE IN NATURA**

Le RIP sono state inizialmente scoperte nelle Angiosperme, sia monocotiledoni che dicotiledoni, mentre non è stata trovata nessuna RIP nelle Gimnosperme finora investigate.

Il livello di RIP nei tessuti vegetali è altamente variabile, da tracce a centinaia di milligrammi per 100 g. In alcune piante, le RIP sono presenti in molti o perfino in tutti i tessuti esaminati (radici, foglie, gambo, corteccia, fiori, frutti, semi, lattice), mentre in altre sembrano essere confinate ad un singolo tessuto. Spesso

forme differenti della stessa RIP sono state trovate nei vari tessuti della stessa pianta. Un esempio è rappresentato dalla saporina, di cui esistono diverse isoforme nei semi, nelle foglie e nelle radici della *Saponaria officinalis* (Ferrerias *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2002).

Le RIP di tipo 1 sono maggiormente diffuse rispetto alle RIP tipo 2, e sembrano essere distribuite preferenzialmente in piante appartenenti ad alcune famiglie, anche filogeneticamente non correlate (tra cui *Caryophyllaceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*). In alcune specie di piante sono state trovate sia RIP di tipo 1 che di tipo 2 (de Benito *et al.*, 1995, 1998; Hao *et al.*, 2001).

Non essendo stata compiuta una ricerca sistematica completa all'interno del regno vegetale, è ragionevole supporre che le RIP possano essere molto più diffuse di quello che si pensi, o perfino ubiquitarie nel regno vegetale.

#### **ALTRI INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA PRESENTI IN NATURA**

Oltre alle tossine di origine vegetale, sono anche conosciuti batteri contenenti proteine capaci di inibire la sintesi proteica. Tra queste, molto nota è la tossina Shiga prodotta da *Shigella dysenteriae*, che inibisce la sintesi proteica con un meccanismo molto simile a quello delle RIP (Sandvig *et al.*, 1991; Brigotti *et al.*, 1997). Infatti, entra nelle cellule per endocitosi mediata da recettori ed ha un'attività catalitica *N-glicosidasi*, il cui bersaglio è l'rRNA ribosomiale 28S, contenuto nella subunità 60S. Il taglio al 3' dell'rRNA 28S causa un mancato legame dell'aminoacil-tRNA al sito A del ribosoma, bloccando quindi la sintesi proteica con conseguente morte cellulare.

Esistono anche altre tossine di origine batterica capaci di inibire la proteinosintesi, ma tramite meccanismi diversi da quelli delle RIP. Le esotossine DT (tossina difterica, prodotta dal *Corynebacterium diphtheriae*), e PE (tossina prodotta da *Pseudomonas aeruginosa*), che hanno assunto nel corso degli anni una grande importanza per quanto riguarda la costruzione di immunotossine, sono in grado di inibire la sintesi proteica in sistemi acellulari. Entrambe hanno una struttura A-B e un'attività ADP-ribosilante che ha come bersaglio la proteina EF-2, fondamentale per la sintesi proteica. Il complesso EF-2-ADP-ribosio che

ne risulta inattiva l'allungamento della sintesi proteica, portando quindi a morte la cellula.

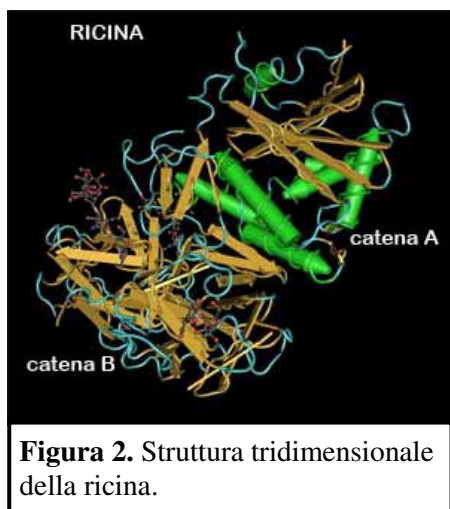
Anche alcune molecole di origine fungina agiscono come enzimi tossici in grado di bloccare la sintesi proteica, nei batteri e negli eucarioti. Tra le tossine fungine utilizzate per la preparazione di immunotossine si annoverano l' $\alpha$ -sarcina, la restrictocina e la mitogillina, prodotte da Ascomiceti e la calcaelina, prodotta da *Mosaic Puffball Mushroom Calvatia caelata*.

## STRUTTURA TRIDIMENSIONALE

Grazie alla clonazione e al sequenziamento di alcune RIP è emersa la similitudine tra le RIP di tipo 1 e la catena A delle RIP di tipo 2, così come tra le catene B di diverse RIP bicatenarie.

La struttura tridimensionale della ricina è stata la prima ad essere ottenuta tramite cristallografia ai raggi X (Montfort *et al.*, 1987; Katzin *et al.*, 1991; Rutenber and Robertus, 1991; Rutenber *et al.*, 1991). La ricina (figura 2) è formata da una catena A di 267 residui legata covalentemente ad una catena B di 262, tramite il ponte disolfuro che si forma tra la Cys259 della catena A e la Cys4 della catena B. La catena A è una proteina globulare costituita da tre domini distinti. La struttura secondaria comprende otto  $\alpha$ -eliche e sei  $\beta$ -sheet. Attraverso la formazione di complessi tra la catena A della ricina, nativa o ricombinante, e nucleotidi contenenti adenina o formicina, un analogo dell'adenina, è stato osservato che sono i residui Tyr80, Tyr123, Glu177, Arg180 e Trp211 a formare il sito di legame per l'adenina (Montfort *et al.*, 1987; Kim and Robertus, 1992; Chaddock and Roberts, 1993), attraverso la formazione di tre legami a idrogeno (Monzingo and Robertus, 1992). Nelle vicinanze del sito attivo sono stati evidenziati sei residui, Asn78, Arg134, Gln173, Ala178, Glu208 Asn209, che pur non essendo coinvolti direttamente nel meccanismo di depurinazione, sono risultati molto importanti per il mantenimento della conformazione catalitica. La catena A contiene inoltre due siti di N-glicosilazione (Rutember and Robertus, 1991), Asn10-Phe11-Thr12 e Asn236-Gly237-Ser238, che non sarebbero però necessari per il corretto *folding* della proteina, in quanto la catena A ricombinante

della ricina espressa in *Escherichia coli* ha la stessa conformazione di quella purificata dai semi di ricino (Mlsna *et al.*, 1993).



La catena B della ricina è formata da due domini associati in tandem, stabilizzati da quattro ponti disolfuro e da interazioni idrofobiche, ciascuno dominio è composto da quattro sottodomini (chiamati rispettivamente 1 $\lambda$ , 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1 $\gamma$ , e 2  $\lambda$ , 2  $\alpha$ , 2 $\beta$ , 2 $\gamma$ ). Dati di diffrazione ai raggi X hanno evidenziato che la catena B è il risultato di una duplicazione genica, infatti i due domini presentano il 32%

di identità di sequenza aminoacidica. Ciascun dominio comprende 12 filamenti  $\beta$ -antiparalleli, connessi da  $\beta$ -turns e  $\Omega$ -loops. I  $\beta$ -sheets sono organizzati in una struttura a trifoglio con tre lobi disposti in modo simmetrico. Quattro ponti disolfuro tra le cisteine 20-39, 63-80, 151-164 e 190-207, stabilizzano il corretto ripiegamento della catena B. Anche qui si trovano due siti di N-glicosilazione (Rimura *et al.*, 1988), Asn95-Gly96-Thr97 e Asn135-Asn136-Thr137. La catena B possiede due siti di legame per il galattosio, situati nei sottodomini 1 $\alpha$  e 2 $\gamma$ . Ciascun sito di legame comprende cinque residui aminoacidici, Asp22, Gln35, Trp37, Asn46, Gln47 per il primo sottodominio e Asp234, Ile246, Tyr248, Asn255 e Gln256 per il secondo. Ciascun sito lega il galattosio attraverso la formazione di legami idrogeno, quattro per il dominio 1 $\alpha$  e tre legami per il dominio 2 $\gamma$ . Nonostante la presenza di un legame a idrogeno in più, il sito nel dominio 1 $\alpha$  è a bassa affinità, mentre il sito in 2 $\gamma$  è ad alta affinità per il legame col galattosio (Yamasaki *et al.*, 1985; Hatakeyama *et al.*, 1986). Oltre a legami a idrogeno, si formano anche interazioni idrofobiche tra l'anello degli zuccheri e i residui aromatici (Trp37, Tyr248) o idrofobici (Ile246) dei siti. Il sito di legame nel secondo domino, a differenza di quello nel primo, può legare anche N-acetilgalattosamina (GalNAc). Questo dipende dalla rotazione dello zucchero che è posizionato in modo che non si formi un ingombro sterico tra il gruppo N-acetilico di GalNAc e la catena laterale di Asp250 situata vicino il sito di legame (Rutember *et Robertus*, 1991). Analisi di diffrazione dell'abrina (Tahirov *et al.*,

1995), della lectina I del vischio (ML-I) (Krauspenhaar *et al.*, 1999), dell'ebulina I (Pascal *et al.*, 2001) e modelli molecolari di diverse RIP di tipo 2 dal sambuco (Peumans *et al.*, 1998; Van Damme *et al.*, 1996 A e B; Van Damme *et al.*, 1997 A e B), indicano che la loro struttura tridimensionale è la stessa della ricina, in particolar modo risultano altamente conservati i cinque residui formanti il sito attivo, così come i residui adiacenti. Sebbene la struttura tridimensionale della catena B sia conservata, ci sono notevoli differenze per quanto riguarda i residui nei siti leganti il galattosio. Fatta eccezione per gli amminoacidi Asp22 e Gln47 nel sito 1 e Ile246, Asn255 e Gln256 per il sito 2, gli altri residui variano notevolmente nelle varie catene B. Questo spiegherebbe la diversa specificità di legame. Infatti, la ricina e altre RIP (come abrina, ML-I, RCA) mostrano specificità verso Gal/GalNAc, mentre altre RIP di tipo 2 riconoscono specificamente residui Gal- o GalNAc- a(2,6)-sialilati (SNA-I, SSA-I). IRAr e IRAb dall'*Iris* interagiscono non solo con il galattosio, ma anche con glicani contenenti mannosio (Hao *et al.*, 2001).

## **BIOSINTESI E MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI**

Come precedentemente accennato, all'interno di uno specifico tessuto vegetale possono trovarsi più isoforme di una stessa RIP. Questo può dipendere da differenze nelle modificazioni post-traduzionali di uno stesso gene oppure dall'espressione di diversi membri di una stessa famiglia genica.

I geni codificanti per la maggior parte delle RIP di tipo 1 sono privi di introni per cui il numero di residui aminoacidici presenti nella pro-RIP e nella forma matura rimane inalterato (Chow *et al.*, 1990). Tuttavia, diverse isoforme di una stessa RIP di tipo 1 possono essere generate da differenze nella glicosilazione della sequenza genica primaria (Di Maro *et al.*, 1999).

Esistono però casi in cui i geni codificanti per diverse isoforme della stessa RIP presentano caratteristiche differenti. Un esempio è rappresentato dal PAP (*Pokeweed Antiviral Protein*), una RIP di tipo 1, presente nella *Phytolacca americana*, nota per le sue proprietà antivirali e per l'elevata attività enzimatica esercitata sui ribosomi.



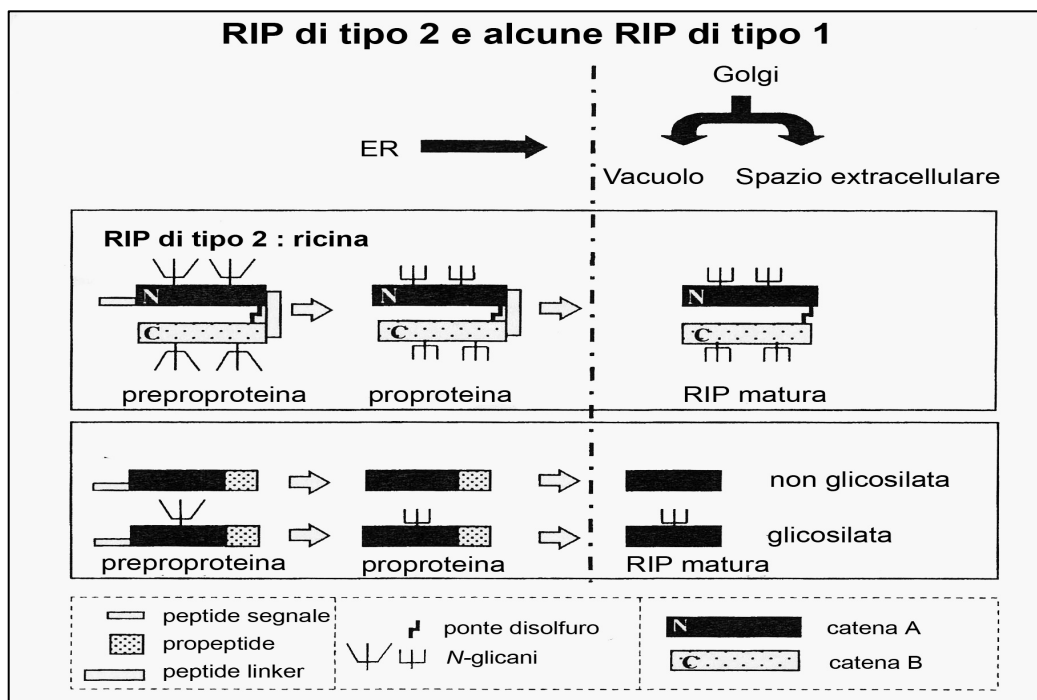
**Tabella 1.** Le isoforme del PAP presenti in natura

Isoforma	Residui	Presenza di introni	Identità con il PAP (%)
	aminoacidici della proteina matura		
PAP	262	NO	-
PAP II	285	SI	33
PAP-S	262	NO	76

Come si evince dalla tabella 1 sopra riportata, la famiglia genica codificante per le tre isoforme del PAP è costituita da sequenze geniche che possono presentare o meno introni. Poyet e Hoeveler hanno ipotizzato che la sequenza genica codificante per il PAP II, contenente una sequenza intronica, può rappresentare il gene ancestrale dal quale derivano le isoforme PAP e PAP-S, formatasi in seguito alla perdita di un introne (Poyet., Hoeveler; 1997).

Molte delle conoscenze che si hanno sulla biosintesi delle RIP derivano da studi compiuti sulla ricina e sulla RCA. Nell'endosperma in via di sviluppo dei semi di *R. communis*, la ricina viene sintetizzata come preproteina inattiva con una sequenza segnale N-terminale e con una breve sequenza di connessione di 12 residui tra la catena A e la B (Lehar *et al.*, 1994; Olsnes *et al.*, 1988) (Figura 3). Durante la traduzione questa preproricina viene traslocata all'interno del reticolo endoplasmatico e durante questo processo il peptide segnale di 35 residui viene tagliato, quattro residui di asparagina vengono *N*-glicosilati e vengono formati cinque ponti (Olsnes *et al.*, 1976) disolfuro, quattro dei quali all'interno della catena B e il quinto tra la porzione C-terminale della catena A e quella N-terminale della catena B. La proricina che ne risulta possiede la capacità di legare gli zuccheri, ma non ha ancora l'attività *N*-glicosilasica. La proRIP viene successivamente trasportata attraverso il reticolo endoplasmatico e il complesso di Golgi fino ai corpi proteici (organelli a singola membrana). Sembra che in questo processo di *targeting* vacuolare giochi un ruolo fondamentale una sequenza all'interno del peptide di connessione della proricina. Durante il trasporto le catene prima glicosilate sono convertite in *N*-glicani complessi. Nei corpi proteici una proteinasi acida elimina la sequenza di connessione e i residui rimasti nella sequenza N-terminale, portando alla formazione della forma matura

della ricina in cui la catena A e B rimangono covalentemente legate tramite un legame disolfuro. La forma matura si trova esclusivamente all'interno dei corpi proteici e rimane quindi sequestrata rispetto ai ribosomi.



**Figura 3:** Biosintesi delle RIP di tipo 2 e di alcune RIP di tipo 1.

Sembra che tutte le RIP di tipo 2 possano essere sintetizzate e rese attive in modo simile. Ci sono però anche RIP che si accumulano nel citosol in forma inattiva e che devono poi subire una trasformazione per essere funzionali.

Attraverso la costruzione di un plasmide ricombinante contenente inserti di DNA complementari all'mRNA della preproRCA, Lynne e i suoi collaboratori sono risaliti all'intera sequenza genica codificante per la preproRCA e usando tecniche di sequenziamento proteico diretto o tramite cDNA, hanno rivelato che l'identità di sequenza esistente tra le diverse isoforme della ricina è circa del 93%. In particolare, la glicina 156, presente nella catena A della ricina, è rimpiazzata da una cisteina nella RCA (RIP tipo 2 non tossica del ricino). Questo residuo è localizzato all'interno di un *loop* idrofilico che protrude verso la cavità presente tra le due eliche maggiori, permettendo la formazione di un ponte disolfuro (Sweeney et al.; 1997). Tra le catene B della ricina e della RCA esiste un'identità di sequenza dell'84%. In questo caso la differenza più significativa è rappresentata dalla sostituzione nella RCA, di un residuo di tirosina con uno di

istidina; la perdita del residuo aromatico impedisce il legame tra l'agglutinina e i carboidrati e, conseguentemente, determina un difetto di traslocazione della proteina attraverso la membrana plasmatica. Una singola sostituzione aminoacidica, dunque, determina la perdita della funzione citotossica dell'RCA. Le differenze nella sequenza delle catene B possono influenzare l'interazione con le cellule e giustificare le differenze nella citotossicità fra le RIP di tipo 2.

Le basi molecolari riguardanti la regolazione genica delle RIP sono ancora largamente sconosciute. Tuttavia, è stato dimostrato che la maggior parte dei geni codificanti per le RIP sono regolati in maniera organo-specifica e in alcuni casi è stato osservato un controllo temporale. Tale specificità d'espressione è dovuta alla presenza di elementi promotoriali, tra cui la sequenza consensus CATGCATY, che nei legumi è coinvolta nella regolazione dell'espressione di alcuni geni che codificano per proteine presenti nei semi. Questo stesso *box* (con ben poche differenze) è presente, in duplice copia, in un gene funzionale della ricina. In diverse specie vegetali, è stato osservato che l'espressione genica di molte RIP di tipo 1 viene incrementata in presenza di stress biotici, abiotici e di molecole segnale. Nelle piante alofile, come *Mesembrianthemum crystallinum*, è stato osservato che un aumento di salinità induce l'espressione delle RIP di tipo 1; in queste specie, inoltre, i livelli di RIP subiscono una fluttuazione diurna (Rippmann, *et al.*, 1997) e un aumento nel periodo della senescenza (Chaudhry, *et al.*, 1994).

## 1.2 ATTIVITA' ENZIMATICA

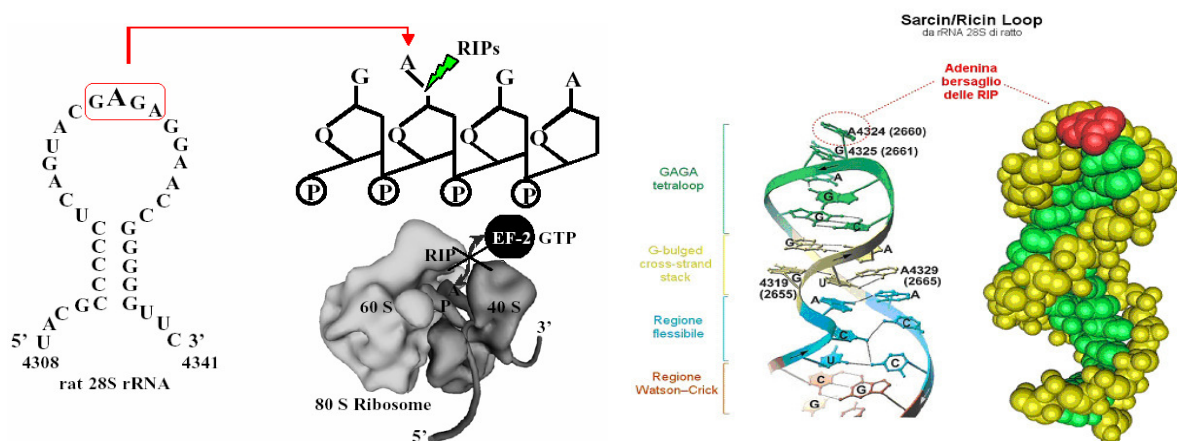
L'inibizione della sintesi proteica cellulare (Lin *et al.*, 1970) è il primo effetto metabolico identificato nelle RIP. Successivamente è stato dimostrato che il loro bersaglio sono i ribosomi (Montanaro *et al.*, 1973) e più precisamente la subunità 60S (Speri *et al.*, 1973) dove, agendo sull'rRNA, impediscono il legame dei fattori di allungamento.

Negli ultimi anni, numerosi studi suggeriscono che l'inibizione della sintesi proteica è solo una delle cause di morte cellulare indotta dalle RIP, indicando che il danno che causa la morte potrebbe precedere l'inibizione della sintesi proteica.

Di seguito vengono esaminate le diverse attività enzimatiche delle RIP.

### ATTIVITÀ RNA N-GLICOSIDASICA A CARICO DEI RIBOSOMI

Endo e collaboratori sono stati i primi ad individuare nella ricina la presenza di un'attività RNA N-glicosilasica (Endo *et al.*, 1987), dimostrando che la tossina riconosce una regione altamente conservata nell'rRNA della subunità maggiore dei ribosomi eucariotici e taglia un legame N-C glicosidico tra una specifica adenina e il suo ribosio nella sequenza GAGA sull'RNA. Il risultato è la rimozione dell'adenina e la creazione di un sito apurinico (Figura 4).



**Figura 4:** Sito d'azione delle RIP sui ribosomi.

Quando come substrato vengono utilizzati ribosomi di ratto, la deadenilazione interessa l'A<sub>4324</sub> nell'rRNA 28S. Questa adenina si trova in un *loop* a singolo filamento, chiamato *loop* sarcina/ricina (o anche GAGA *loop*), situato nel dominio VII del ribosoma, approssimativamente a 400 nucleotidi dall'estremità 3' dell'rRNA (Endo *et al.*, 1987, 1988) ed essenziale per l'interazione del fattore di allungamento con i ribosomi (Sperti *et al.*, 1973, 1976, Montanaro *et al.*, 1973). Tutte le RIP hanno attività RNA N-glicosilasica verso i ribosomi, ma esistono chiare differenze nella specificità di substrato. Infatti, mentre alcune RIP mostrano una specificità molto ampia (come la PAP che deadenila i ribosomi di piante, lieviti, batteri e animali) altre come la ricina, sono efficienti sui ribosomi

animali e di lieviti, ma risultano molto scarse verso i ribosomi di piante e batteri (vedi rassegna Barbieri *et al.*, 1993). La diversa specificità di substrato è determinata non solo dalla RIP, ma anche dal ribosoma. Molto probabilmente infatti sono le proteine ribosomiali che facilitano o meno l'accesso delle RIP al *loop* sarcina/ricina. Per esempio, le proteine ribosomiali L9 e L10 del fegato di ratto sono i target di legame della ricina (Vater *et al.*, 1995), mentre la proteina ribosomiale L3 del lievito è il fattore di legame della PAP (Hudak *et al.*, 1999). La proteina L3 è altamente conservata e questo spiegherebbe l'ampio spettro di specificità del PAP verso ribosomi di differenti organismi. Anche la struttura delle RIP influenza molto la loro attività enzimatica e la specificità verso i substrati. Uno studio condotto sull'attività del PAP e della ricina su lisato di reticolociti di coniglio e ribosomi di *E. coli* (Chaddock *et al.*, 1996) ha evidenziato che è la sequenza aminoterminale delle proteine ad essere deputata alla specificità di substrato, mentre le porzioni superficiali dei vari *loop* non sembrano avere un ruolo significativo.

Sebbene i ribosomi nativi siano il substrato preferenziale, le RIP possono anche agire su rRNA nudo (privo di proteine) e su oligoribonucleotide sintetici che mimino il *loop* sarcina/ricina (Endo *et al.*, 1991). E' interessante sottolineare come alcune RIP possono deadenilare rRNA nudo proveniente da ribosomi verso cui normalmente non mostrano specificità. Per esempio, la catena A della ricina non agisce sui ribosomi intatti di *E. coli*, ma è in grado di deadenilare il suo RNA 23S nudo.

#### **ATTIVITÀ POLINUCLEOTIDE:ADENOSINA GLICOSILASICA (PNAG)**

L'attività RNA *N*-glicosidasica a carico dei ribosomi è stata considerata per molto tempo l'unica funzione enzimatica delle RIP. Nel corso degli anni, sono stati effettuati numerosi sforzi per cercare substrati alternativi, ma la difficoltà principale è stata soprattutto la mancanza di un metodo sufficientemente sensibile che identificasse i prodotti di reazione. Nel 1989, lo sviluppo di una tecnica di HPLC basata sulla fluorescenza (Zamboni *et al.*, 1989) ha permesso sia di

rivelare le adenine rilasciate dall'azione delle RIP sui ribosomi, sia di individuare un'attività delle RIP, fino ad allora sconosciuta, a carico di altri substrati.

Inizialmente, è stato dimostrato che la saporina L-1, è in grado di rimuovere più residui di adenina da diversi tipi di acidi nucleici, come: DNA di sperma di aringa (hsDNA), Poly(A), tRNA e RNA del virus del mosaico del tabacco (TMV) (Barbieri *et al.*, 1994, 1996). Questo tipo di attività, è stata anche riscontrata su substrati come il DNA mitocondriale e nucleare.

Ulteriori indagini su 52 RIP hanno confermato la capacità di queste proteine di agire su DNA di sperma di aringa e poli (A) ed è inoltre stato osservato che circa un terzo delle RIP è in grado di agire su RNA di TMV (Barbieri *et al.*, 1997). Altri studi hanno rivelato che PAP-I, PAP-II e PAP-III deadenilano in maniera dose dipendente l'RNA di HIV-1, di TMV e del batteriofago MS2. Alla luce di questi risultati , è stato proposto di definire l'attività enzimatica delle RIP polinucleotide:adenosina glicosidasica (PNAG). Tuttavia, le RIP mostrano una notevole differenza per quanto riguarda la loro attività PNAG. Questo probabilmente dipende dalle diversità strutturali tra le varie proteine, dal tipo di substrato e dalle condizioni (per esempio pH e temperatura) in cui è condotta la reazione.

Una nota di particolare interesse è rappresentata dalla capacità delle RIP di deadenilare l'RNA virale. Molte RIP infatti sono inibitori di virus animali e vegetali, attraverso meccanismi d'azione ancora non del tutto chiari. Ci sono prove che l'azione antivirale delle RIP non è da attribuire esclusivamente alla capacità di inibire i ribosomi, ma anche al fatto che le RIP sono in grado di interagire direttamente con il DNA o l'RNA virale.

#### **ATTIVITÀ POLINUCLEOTIDE:GUANOSINA GLICOSILASICA**

Già nel 1987 Endo e collaboratori (Endo *et al.*, 1987) hanno osservato la capacità della ricina di rimuovere un residuo di guanina (G<sub>4323</sub>) dal *loop* sarcina/ricina dei ribosomi di fegato di ratto. Più recentemente, un'attività analoga è stata osservata anche per la PAP (Rajamohan *et al.* 1999). Questa RIP è risultata in grado di deguanilare l'RNA ribosomiale di *E. coli*, ma anche reticolociti di coniglio e

ribosomi di lievito (Hudak *et al.*, 2000). Da esperimenti di modellistica molecolare è stato confermato che la guanina è in grado di inserirsi nella tasca del sito attivo della PAP, tra i gruppi laterali di Tyr72 e Tyr123 proprio come l'adenina, senza disturbare la geometria e la conformazione dell'enzima (Kurinov *et al.*, 1999).

La capacità di rimuovere un residuo di guanina non è, però, estendibile ad altre RIP. Vari esperimenti sono stati condotti con gelonina, saporina e momordina e nessuna di queste è stata in grado di rimuovere nessuna altra base diversa dall'adenina (Barbieri *et al.*, 2000).

### **1.3 CITOTOSSICITA'**

#### **INTERAZIONE DELLE RIP CON LE CELLULE**

Come tutte le proteine esogene, anche le RIP per svolgere la propria attività enzimatica intracellulare devono attraversare la membrana plasmatica. Gli studi condotti per chiarire quali siano i meccanismi che favoriscono l'ingresso delle RIP nelle cellule hanno evidenziato il coinvolgimento di molecole fisiologiche (vedi rassegna Olsnes e Sandvig, 1988; Sandvig *et al.*, 1991, 1992, (rassegna) 1993; Lendaro *et al.*, 1994) e non di meccanismi di trasporto specifici.

L'ingresso delle RIP di tipo 2 all'interno delle cellule dipende dal legame della catena B ai residui di galattosio presenti sulle glicoproteine e sui glicolipidi della membrana cellulare ed avviene grazie ad un processo di endocitosi che può coinvolgere:

1. recettori localizzati in depressioni specializzate della membrana che danno origine a vescicole rivestite di clatrina (vedi rassegne: Sandvig *et al.*, 1996, 1999 e Gonatas *et al.*, 1998)
2. sistemi di trasporto clatrina indipendenti in cui sono coinvolte chinasi, proteine G e cAMP (Holm *et al.*, 1995; Jackman *et al.* 1999; Llorente *et al.*, 2000).

Nel caso della ricina (vedi rassegna Lord *et al.*, 1994) esiste un altro riconoscimento reciproco tra la RIP e la cellula. Infatti, il suo legame nel caso delle cellule ad attività macrofagica avviene anche in seguito al riconoscimento tra i residui di mannosio presenti su entrambe le catene della RIP e i recettori per il mannosio esposti sulla superficie delle cellule (Skiller *et al.*, 1981; Magnusson *et al.*, 1993; Battelli *et al.*, 2001).

Come accennato precedentemente, le RIP di tipo 2 presentano differenze di citotossicità, ne è un esempio la nigrina b che rispetto alla ricina risulta molto meno tossica per le cellule. Una possibile spiegazione risiede nel diverso meccanismo d'entrata supposto per le due RIP. Nel 2001 Munos e collaboratori hanno ipotizzato che la ricina venga internalizzata negli endosomi attraverso due tipi di recettori chiamati R1 e R2. Il primo lega sia la ricina che la nigrina b, formando un complesso recettore-RIP. Attraverso la via endosomiale, il complesso raggiunge il sistema lisosomiale dove le RIP possono essere degradate oppure esocitate intatte. Il recettore R2, invece, lega solo la ricina, che arriva all'apparato del Golgi attraverso la via endosomiale; a questo punto un trasporto retrogrado permette il passaggio della RIP dal Golgi al reticolo endoplasmatico dove manifesta la sua tossicità sui ribosomi. Questo potrebbe spiegare la minore tossicità della nigrina b rispetto alla ricina.

L'ingresso delle RIP di tipo 2 nelle cellule avviene, principalmente, attraverso un meccanismo di endocitosi dipendente dalla disponibilità di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e di energia (Sandvig e Olsnes, 1982 a, b). Risultati sperimentali dimostrano che inibendo la formazione delle vescicole rivestite di clatrina, tramite shock ipotonico e deplezione di potassio o per acidificazione del citosol, non si ha abolizione della citotossicità della ricina (vedi rassegne Sandvig e van Deurs, 1996, 1999), suggerendo che la formazione delle vescicole di clatrina non riveste un ruolo fondamentale nel processo di internalizzazione cellulare della RIP (Simpson *et al.*, 1995).

In caso di endocitosi clatrina-dipendente, affinché possa avvenire la gemmazione delle vescicole rivestite dalla superficie cellulare, è necessaria la formazione di un anello di dinamina-GTP intorno all'imboccatura dell'invaginazione della membrana. L'attività GTPasica della dinamina permette la chiusura dell'anello e



il distacco della vescicola (Damke, 1996). L'endocitosi può anche avvenire attraverso vie alternative come la pinocitosi in fase fluida (vedi rassegne Sandvig e van Deurs, 1996, 1999).

Inoltre, nel caso delle RIP bicateinarie non sembra esistere nessuna correlazione tra il numero di siti di legame per le RIP sulla superficie delle cellule e la sensibilità che queste ultime mostrano verso le stesse RIP. Per esempio, le cellule HeLa sono più sensibili alla modeccina che alla ricina (vedi rassegna Barbieri *et al.*, 1993), pur avendo un numero di recettori per la ricina ( $1-3 \times 10^7$ /cellula) (Sandvig *et al.*, 1976) maggiore che per la modeccina ( $2 \times 10^5$ /cellula) (Olsnes *et al.*, 1978).

Per le RIP di tipo 1, essendo prive di catena lectinica, l'ingresso nelle cellule risulta più difficoltoso. Alcune RIP monocateinarie come la gelonina e la diantina sono glicosilate, per questo è stato ipotizzato che il loro ingresso possa avvenire in seguito all'interazione dei residui glucidici con la membrana cellulare (vedi rassegna Barbieri *et al.*, 1993). Un altro meccanismo ipotizzato è una endocitosi in fase fluida senza mediazione dei recettori (pinocitosi) (Madan *et al.*, 1992).

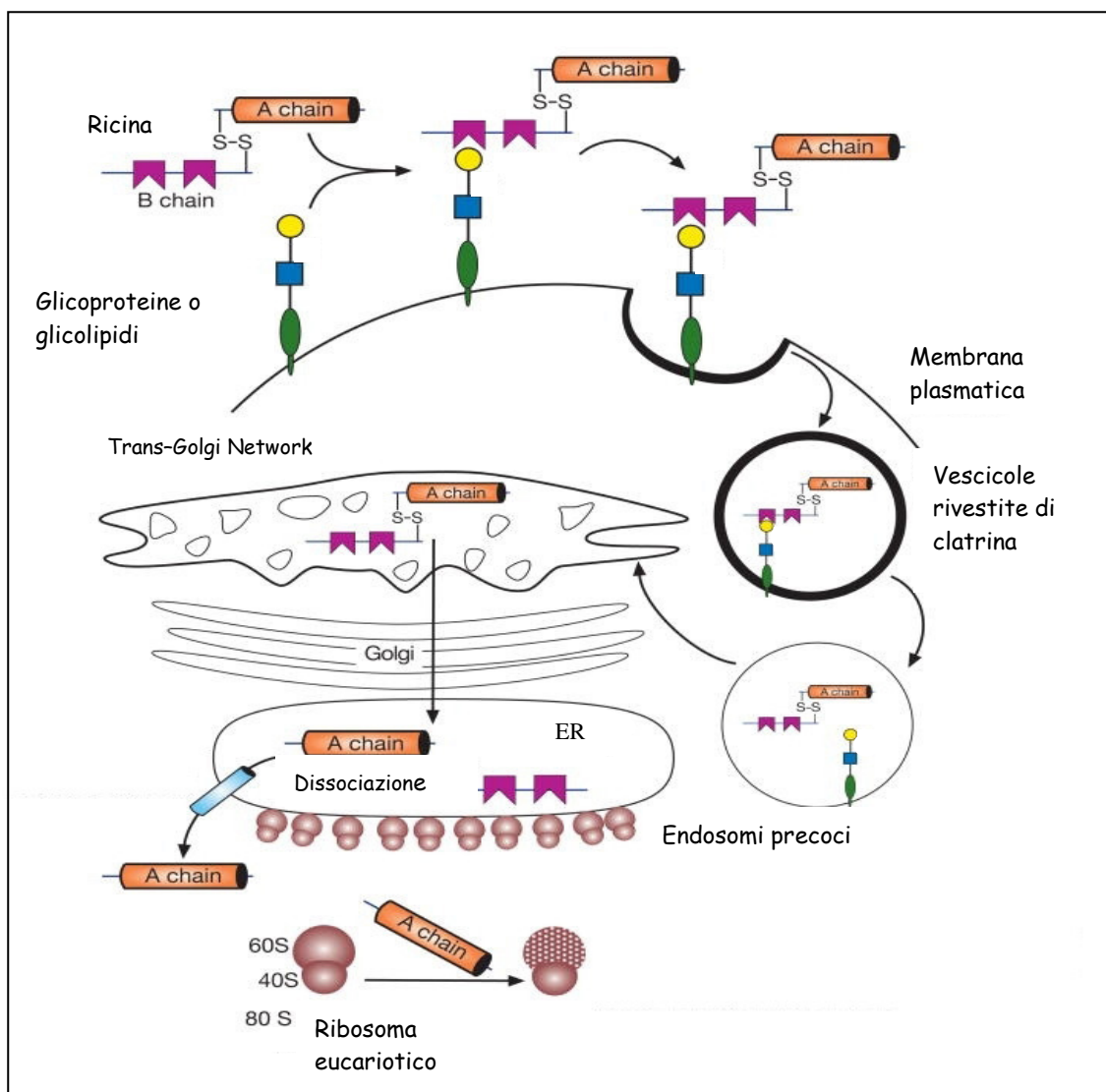
È stato descritto un meccanismo di interazione fra una RIP monocateinaria, la saporina, ed il recettore per l'alfa 2-macroglobulina ( $\alpha_2$ MR), una glicoproteina di membrana responsabile del legame e dell'endocitosi di diversi ligandi. Tale interazione con il recettore potrebbe essere diretta oppure mediata dal ligando ( $\alpha_2$ M) (Cavallaro *et al.*, 1993). L'osservazione che anche la catena A della ricina sia in grado di legare l' $\alpha_2$ MR (Ghetie *et al.*, 1991) avvalorata l'ipotesi dell'esistenza di un meccanismo generale di interazione fra le RIP e le membrane cellulari mediata dal recettore  $\alpha_2$ MR. L'interazione avverrebbe attraverso domini del recettore carichi positivamente, questo risultato ben si accorda con il punto isoelettrico altamente basico delle RIP.

Quest'ipotesi potrebbe spiegare anche la differente sensibilità esistente tra diversi tipi cellulari. I linfociti T e alcune linee cellulari, come la Jurkat, non esprimono l' $\alpha_2$ MR in superficie (Petersen *et al.*, 1987) e risultano tra le più resistenti alla saporina (Siena *et al.*, 1988, Barbieri *et al.*, 1989, Tazzari *et al.*, 1992, Cavallaro *et al.*, 1993). Mentre i macrofagi ed altre APC (*antigen presenting cells*), o linee

cellulari come la U937, che notoriamente sono molto sensibili alle RIP (vedi rassegna Stirpe *et al.*, 1992, Cavallaro *et al.*, 1993), esprimono alti livelli di recettore per l' $\alpha_2\text{M}$  (Moestrup *et al.*, 1992).

### **ROUTING INTRACELLULARE DELLE RIP**

Per poter esercitare la loro citotossicità le RIP devono essere in grado di entrare all'interno della cellula e, sfruttandone i meccanismi di trasporto vescicolare, di raggiungere il proprio substrato. Le varie tappe di questo percorso intracellulare vengono indicate come *routing*. Il *routing* intracellulare della ricina è stato ben chiarito (van Deurs *et al.*, 1986) (figura 5).



**Figura 5:** rappresentazione schematica dell'ingresso e del *routing* intracellulare della ricina nelle cellule di mammifero (ER, reticolo endoplasmatico).

La ricina viene internalizzata mediante endocitosi tramite vescicole rivestite o non, in seguito al legame della catena B lectinica ai residui di galattosio presenti sulle glicoproteine e i glicolipidi esposti sulla superficie delle cellule. La vescicola endocitica matura in endosoma precoce e da qui può seguire diverse vie:

1. può essere reindirizzata verso la superficie cellulare; in questo caso la RIP viene esocitata intatta e può intossicare cellule adiacenti, mentre il recettore viene riciclato;
2. può seguire la via classica dell'endocitosi, l'ambiente sempre più acido degli endosomi fa sì che la maggior parte della proteina finisca nei lisosomi, si dissocia dal recettore e venga degradata;
3. può convergere verso le vescicole dell'apparato del Golgi, evenienza che riguarda circa il 5% del complesso RIP-recettore (van Deurs *et al.*, 1988). Solitamente, il passaggio dagli endosomi al TGN (trans Golgi network) è associato alla GTPasi Rab9, ciò però non sembra essere valido per la ricina (Iversen *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 1998).

Solo la quota che raggiunge il TGN è responsabile dell'intossicazione della cellula (vedi rassegna Sandvig *et al.*, 1993). Dal TGN la ricina passa all'apparato del Golgi e il trasporto retrogrado (rispetto alla via classica dell'esocitosi) finisce nel lume del reticolo endoplasmatico (RE). Quest'ultimo passaggio può dipendere da COP-I (coat protein I), una proteina presente sulla superficie di vescicole contenenti materiale da riciclare. Tuttavia studi condotti sulla ricina hanno evidenziato che il blocco della funzione di COP-I non protegge le cellule dall'intossicazione (Chen *et al.*, 2002). Nel lume del RE, l'attività dell'enzima disolfide isomerasi riduce il ponte disolfuro presente tra le catene della RIP di tipo 2, permettendo alla catena A di trasferirsi nel citosol dov'è libera di agire sul suo substrato.

L'approdo nel lume del reticolo endoplasmatico è un requisito fondamentale per l'intossicazione cellulare, per cui la ricina deve necessariamente raggiungere il Golgi dove sono presenti *carrier* proteici che permettono un trasporto retrogrado verso il reticolo endoplasmatico.

Un ruolo chiave nel destino intracellulare della ricina sembra essere giocato da due chaperonine cellulari, Hsc70 e Hsp90 (Spoonner *et al.*, 2008). Sia *in vitro* che *in vivo* è stata osservata la presenza di interazione tra la catena A della ricina (RTA) e Hsc70, questo legame influenza l'attività catalitica e la resistenza alla degradazione della RIP. Infatti, il legame con Hsc70 o con Hsp90 determina la degradazione della RTA, poiché entrambe queste chaperonine interagendo con la proteina E3 danno il via al processo di ubiquitinazione che scatena l'evento della degradazione proteasomale. L'azione di Hsc70 è anche molto importante nella fase di passaggio della ricina nel citosol. Infatti, la RIP nell'attraversare le membrane del reticolo endoplasmatico perde la sua conformazione tridimensionale risultando inattiva e molto vulnerabile. Il *folding* nativo necessario alla RIP per esercitare la propria attività catalitica viene recuperato grazie ad un meccanismo in cui è coinvolta la proteina Hsc70.

Lo stesso meccanismo di ingresso e *routing* intracellulare definito per la ricina, è stato trovato per la pulchellina, una RIP di tipo 2 estratta dai semi di *Abrus pulchellus tenuiflorus* (Goto *et al.*, 2007).

Le caratteristiche riguardanti il traffico intracellulare di alcune RIP di tipo 2 sono ormai abbastanza conosciute, tuttavia rimangono ancora poco note le caratteristiche delle RIP di tipo 1 e delle RIP non tossiche di tipo 2.

Il *routing* intracellulare della saporina non è ancora del tutto chiarito. Alcuni risultati sono stati ottenuti tramite studi biochimici, condotti usando sostanze che alterano determinate strutture cellulari come brefeldina A (che altera la struttura delle cisterne del Golgi) e clorochina (agente lisosomotropo che si accumula nei lisosomi aumentandone il pH e viene comunemente usato per indagare il loro ruolo nei processi cellulari), abbinati a studi di immunofluorescenza. Questi dati dimostrano che, al contrario della ricina, la saporina segue la via endosomale classica che confluisce a livello dei lisosomi e che il suo *routing* non coinvolge il Golgi (Vago *et al.*, 2005).

Recentemente è stata individuata la modalità di intossicazione cellulare adottata dalla tricosantina (Zhang *et al.*, 2009), una RIP di tipo 1 estratta da *Trichosanthes kirilowii* ed usata da secoli dalla medicina cinese per indurre l'aborto. Zhang ed i suoi collaboratori hanno dimostrato come la tricosantina riesca ad aggirare la

degradazione lisosomiale sfruttando il *multivescicular body* (MVB) cellulare. La tossina dopo essere stata endocitata viene dapprima incorporata dal complesso del MVB e successivamente secreta fuori dalla cellula all'interno di vescicole simili a lisosomi. Questo permette alla RIP di essere nuovamente internalizzata e di raggiungere molto rapidamente la regione perinucleare dove può attivare i processi di morte cellulare.

È possibile che il percorso seguito dalle RIP di tipo 1 all'interno delle cellule dipenda dalla modalità di ingresso (vedi rassegna Barbieri *et al.*, 1993).

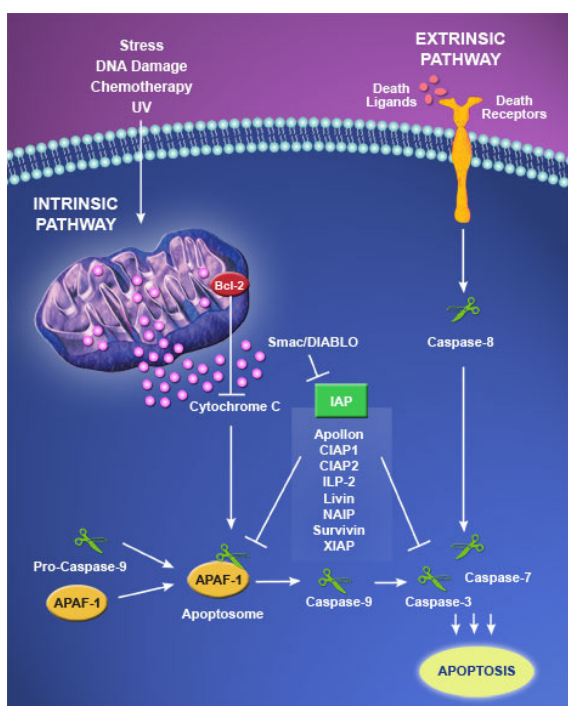
La ridotta tossicità delle RIP di tipo 2 non tossiche dipende in parte dalla loro scarsa capacità di traslocare all'interno delle cellule; per esempio l'ebulina, estratta da *Sambucus ebulus*, è poco affine per il galattosio (Pascal *et al.*, 2001). Tuttavia la scarsa citotossicità di questa categoria di RIP va ricercata prevalentemente nel loro destino intracellulare, poichè spesso la loro internalizzazione avviene tramite la catena B in maniera del tutto analoga alla ricina, come accade per la nigrina b, la cui bassa tossicità è giustificata dalla precoce degradazione ed espulsione dalla cellula (Battelli *et al.*, 2004). Anche la volkensina (RIP di tipo 2) viene rapidamente espulsa dalla cellula ma non viene degradata, ciò rende possibile il suo ingresso in altre cellule (Battelli *et al.*, 2004). La resistenza alla degradazione, probabilmente dovuta al basso contenuto di lisina, fa sì che la volkensina esibisca un'elevata tossicità (Chambery *et al.*, 2004).

## **RIP E APOPTOSI**

Prima che venissero intrapresi studi specifici, si pensava che la morte delle cellule intossicate con RIP o immunotossine contenenti RIP, avvenisse per necrosi dovuta all'arresto della sintesi proteica.

Successivamente, studi morfologici sulle cellule trattate con alcune RIP, tra cui ricina e abrina (Griffith *et al.* 1987, Hughes *et al.*, 1996, Kochi *et al.*, 1993), momordica (Li *et al.*, 2009), PAP-S, saporina (Bolognesi *et al.*, 1996), gelonina (Langer *et al.*, 1999; Kojio *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000; Vervecken *et al.*, 2000; Van Huyen, *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2003),

volkensina (Bussing *et al.*, 1998) e lectine del vischio Janssen *et al.*, 1993; Bussing *et al.*, 1996) hanno evidenziato gli stessi elementi distintivi delle cellule in apoptosi, tra cui la formazione di corpi apoptotici, la condensazione eterocromatinica e il DNA *laddering* condensazione eterocromatinica e il DNA *laddering*. Il meccanismo usate dalle RIP per indurre il processo di morte cellulare programmata rimane ancora da chiarire, ma molte ipotesi sono state avanzate.



**Figura 5:** Via intrinseca e via estrinseca dell'apoptosi in cellule di mammifero. Immagine dal sito [www.imgenex.com](http://www.imgenex.com).

Per molto tempo i ricercatori hanno indagato su una possibile correlazione tra l'inibizione della sintesi proteica e l'esordio del processo apoptotico senza, almeno per il momento, aver chiarito il problema (vedi rassegna Narayanan *et al.*, 2005). Certamente non è da escludere che l'innescò del processo apoptotico sia in parte indotto dai danni provocati dalle RIP ai ribosomi e al DNA.

Recentemente sono stati condotti diversi studi per chiarire i meccanismi attraverso cui le RIP innescano il processo apoptotico. La saporina-6 per esempio, è risultata in grado di attivare la morte cellulare per la via intrinseca in diversi tipi cellulari. Gli studi hanno evidenziato un forte coinvolgimento dei mitocondri con perdita del potenziale mitocondriale, rilascio del citocromo c nel citosol, attivazione della caspasi 9 ed un notevole incremento delle specie reattive

dell'ossigeno (ROS). In alcuni casi è stato dimostrato che l'attività N-glicolidasica della RIP non è necessaria per l'innescare della cascata apoptotica (Sikriwal *et al.*, 2008). La ricina nell'indurre apoptosi è risultata ancora più efficiente della saporina. Infatti, sfruttando le caratteristiche della propria catena lectinica, che si lega a molecole di superficie, la ricina è in grado di innescare la via estrinseca tramite attivazione della caspasi 8 (figura 5) (Hasegawa *et al.*, 2000). La citotossicità della catena A sembra invece essere legata ad un motivo strutturale della molecola, completamente distinto dal sito attivo (Baluna *et al.*, 2000). Un dato molto interessante, è la scoperta di un bersaglio nucleare proprio della ricina. Intossicando cellule HUVEC sono stati osservati danni molto precoci al DNA nucleare che precedono l'apoptosi (Brigotti *et al.*, 2002). Nella linea cellulare HeLa è stato osservato che la ricina, come la maggior parte delle RIP analizzate, innesca l'apoptosi sia tramite attivazione della famiglia delle caspasi (caspasi 3, 6, 8 e 9), sia bloccando il ciclo cellulare tra le fasi G2/M (Gan *et al.*, 2001). Come verrà successivamente approfondito, le RIP possiedono attività antivirali e antitumorali. Alcuni dati recenti relativi alla MAP30 (RIP monocatenaria, estratta da *Momordica charantia*) suggeriscono che l'attività antitumorale sarebbe da attribuire proprio alla capacità della RIP di sopprimere la proliferazione cellulare, inducendo un accumulo di cellule in G1, e di innescare l'apoptosi (Li *et al.* 2009).

È noto che le cellule rispondono a molte condizioni di stress (*shock* termico, infezioni virali, perdita di ATP) avviando il meccanismo di morte cellulare programmata. In questi casi i mitocondri giocano un ruolo chiave, infatti la perdita del potenziale di membrana mitocondriale potrebbe essere il punto di non ritorno nella cascata apoptotica. Molti studi sull'apoptosi indotta da RIP hanno evidenziato il marcato coinvolgimento dei mitocondri, che vengono quindi ritenuti dei buoni candidati nel percepire lo stress indotto dalle RIP (Narayanan *et al.*, 2004). Anche il calcio, com'è noto, assume un ruolo molto importante nella via apoptotica mitocondriale (Lennon *et al.*, 1992). A questo proposito, è stato osservato che la ricina provoca un rapido aumento dei livelli di calcio intracellulare ed extracellulare nelle cellule di epatoma (Hu *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

Degno di nota è il caso dell'abrina, poiché la sua azione risulta indipendente dall'attivazione della caspasi 8 e del “*death receptor*” (DR) stesso. Diverse evidenze sperimentali hanno suggerito che l'abrina attiva l'apoptosi per via intrinseca (Narayanan *et al.*, 2004) interagendo direttamente con la proteina mitocondriale AOP-1 (anti-oxidant protein-1) (Shih *et al.*, 2001) e provocando un calo della sua funzione antiossidante con conseguente aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e rilascio del citocromo c.

Concludendo, è importante sottolineare che le RIP sono in grado di innescare più di un meccanismo di morte, poiché agiscono provocando diversi tipi di danno al macchinario cellulare (Polito *et al.*, 2009).

## 1.4 ATTIVITA' BIOLOGICHE

### ATTIVITÀ ANTITUMORALE (IMMUNOTOSSINE)

La maggiore tossicità delle RIP per le cellule neoplastiche rispetto alle cellule sane, era nota ancor prima che venisse scoperto il loro meccanismo d'azione (Lin *et al.*, 1970, 1971; Fodstad *et al.*, 1977). Tale effetto è probabilmente dovuto alla più alta permeabilità di membrana delle cellule tumorali, determinata dai cambiamenti nella composizione lipidica e proteica tipici della cellula neoplastica. La differenza di tossicità fra i due tipi cellulari è però troppo modesta perché queste tossine possano essere impiegate in una eventuale terapia antitumorale. Solo la coniugazione delle RIP con vettori specifici (soprattutto anticorpi monoclonali, ma anche con ormoni, citochine, neuropeptidi, etc) ha reso possibile considerare l'impiego di queste molecole a scopo terapeutico. Infatti le RIP, sia mono che bicatenarie, sono state usate per la preparazione di immunotossine e di altri coniugati, sia tramite *link* chimico che come proteine di fusione. Data la non selettività della catena B, le RIP di tipo 2 possono essere usate solo in seguito all'isolamento della catena A o al blocco dei siti di legame per il galattosio. Immunotossine sono state preparate, per la terapia sperimentale di neoplasie, per immunosoppressione e per terapie contro malattie virali, coniugando le RIP prevalentemente con anticorpi contro antigeni espressi da



cellule cancerose (vedi rassegna Frankel *et al.*, 2000), da cellule immunocompetenti (vedi rassegna Knechtle, 2001) o da cellule infette da virus, soprattutto da HIV (vedi rassegna Pincus and Tolstikov, 1995). Il funzionamento delle immunotossine *in vitro* è abbastanza soddisfacente, ma attualmente il loro impiego in terapia è impedito sia dai vari effetti collaterali (che includono febbre, stanchezza, mialgia e sindrome da aumentata permeabilità capillare), sia dalla risposta immune dell'organismo, che potrebbe comunque essere ridotta con trattamenti immunosoppressivi o utilizzando anticorpi monoclonali umanizzati. È importante sottolineare che le immunotossine sono più efficienti su piccole masse e soprattutto su tumori ematologici, suggerendo che una prima difficoltà *in vivo* potrebbe essere la loro penetrazione nelle masse tumorali.

#### **ATTIVITÀ ANTIVIRALE (HIV) E INSETTICIDA**

L'attività antivirale esercitata nelle piante e negli animali caratterizza tutte le RIP di tipo 1 e solo alcune delle RIP di tipo 2, ovvero quelle estratte da *Eranthis hyemalis* e *Sambucus nigra*.

I primi ad essere studiati sono stati gli effetti provocati dalle RIP sui virus vegetali. Trasfettando le piante infette con geni codificanti per diverse RIP di tipo 1 (vedi rassegna Wang *et al.*, 2000) si assiste ad un aumento della resistenza della pianta all'infezione virale, mentre usando RIP di tipo 2 si ottengono risultati più scarsi. L'attività esercitata dalle RIP contro i virus animali è stata studiata con lo scopo di creare una terapia utile agli ammalati di AIDS. Gli studi sono stati condotti utilizzando PAP e tricosantina. Sebbene entrambe le proteine fossero in grado di inibire la replicazione delle cellule infette, la risposta immunitaria scatenata dall'organismo verso le proteine esogene spesso aggravava le condizioni del paziente e causava reazioni allergiche (Gargia *et al.*, 1993; Byers *et al.*, 1994).

Il meccanismo dell'attività antivirale non è ancora completamente chiaro. Inizialmente si pensava che le RIP danneggiassero i ribosomi delle cellule infette, con conseguente morte cellulare e blocco della proliferazione virale. Successivamente, è stato accertato che l'attività antivirale non è legata alla

capacità delle RIP di danneggiare i ribosomi. Il PAP, per esempio, inibisce la proliferazione del virus HIV senza provocare nessun danno ai ribosomi, probabilmente ciò è dovuto alla sua capacità di agire direttamente sugli acidi nucleici, depurinando l'RNA virale (Rajamohan *et al.*, 1999). Recentemente è stato osservato che l'attività antivirale della tricosantina è dovuta alla sua capacità di inibire JNK (c-Jun N-terminal kinase), una chinasi che regola positivamente l'inizio della trascrizione cellulare (Ouyang *et al.*, 2006).

Concludendo, non è da escludere che le RIP siano in grado di indurre un incremento della resistenza ai virus attraverso meccanismi indiretti, come la stimolazione di sistemi di difesa alternativi delle piante.

### **IMMUNOGENICITÀ, ALLERGENICITÀ, IMMUNOSOPPRESSIONE**

Le caratteristiche immunogene delle RIP sono note da quando Paul Ehrlich, somministrando piccole quantità di abrina tramite iniezione sottocutanea, è riuscito ad ottenere l'immunizzazione degli animali trattati. Tuttavia, in India già da tempi antichissimi era praticata l'immunizzazione di capi di bestiame con piccole quantità di semi d'abrina per evitare le intossicazioni provocate dalle tossine, contenute in questo vegetale (vedi rassegna Olsnes *et al.*, 2004).

Gli studi di Ehrlich portarono alla luce alcune caratteristiche dell'immunità adattativa, tra cui la specificità della risposta difensiva. Infatti, un animale immunizzato contro la ricina risultava immune alla sua somministrazione, ma era ancora sensibile all'abrina e viceversa (Ehrlich, 1891).

Oggi è ben noto che tutte le RIP sono altamente immunogeniche, e che la loro somministrazione ad animali causa la formazione di anticorpi, con cross-reattività solo fra RIP derivanti da piante appartenenti alla stessa famiglia (Strocchi *et al.*, 1992).

La maggioranza delle RIP di tipo 1 e tra quelle di tipo 2 almeno la ricina, sono potenti allergeni, in grado di indurre la produzione di IgE non solo contro se stesse (Zheng *et al.*, 1991, 1995), ma anche contro altri antigeni iniettati contemporaneamente (Thorpe *et al.*, 1989).

Le RIP hanno effetto immunosoppressivo, sia verso la risposta umorale che cellulo-mediata, poichè la loro somministrazione impedisce la formazione di anticorpi e ritarda il rigetto del trapianto (Spreafico *et al.*, 1983; Descotes *et al.*, 1985; Benigni *et al.*, 1995). Tutto ciò avviene solo se le RIP sono somministrate prima dell'antigene, suggerendo che esse possano intervenire nei primi step della risposta immune. Una possibilità è che esse possano agire eliminando le cellule presentanti l'antigene (APC), possibilità in accordo, con la loro alta tossicità per i macrofagi. Per questa proprietà, le RIP potrebbero essere ottimi *tools* sperimentali, utili per sopprimere la risposta immune soltanto verso un antigene somministrato dopo la RIP, senza alterare l'immunità esistente.

### **ATTIVITÀ ABORTIVA**

Per secoli, la medicina tradizionale cinese ha usato estratti ottenuti dalle radici di *Trichosanthes kirilowii* per indurre aborto a medio termine (Wang 1985), con il 95% di successo e con effetti collaterali minimi. Il principio attivo contenuto in questi estratti è la tricosantina, ma anche la momordina (Yeung *et al.*, 1988) e altre RIP (Ng *et al.*, 1992) hanno mostrato proprietà abortive. La tricosantina è altamente tossica verso i trofoblasti e le cellule derivanti da coriocarcinoma (Battelli *et al.*, 1992) e, quando somministrata nel liquido amniotico, causa necrosi delle cellule sinciziotrofoblastiche e frammentazione dei villi placentali. Aggregati di cellule disintegrate causano coaguli di sangue e blocco della circolazione, portando a larghe aree di necrosi nella placenta e alla morte del feto.

### **ATTIVITÀ TRASFORMANTE**

Le RIP con la loro attività di DNA-depurinazione possono indurre modificazioni genetiche e quindi trasformazioni cellulari (Barbieri *et al.*, 2003). Infatti, tutte le RIP saggiate (tranne la gelonina) possono causare trasformazione di cellule 3T3, già a concentrazioni molto basse. Inoltre, le RIP depurinano la poly (ADP-ribosyl)ated poly(ADP-ribose) polymerase (PARP attivata), che è coinvolta nei sistemi di riparazione del DNA (Sato *et al.*, 1994). Concludendo, è possibile che

l'attività trasformante delle RIP derivi dalla combinazione dei danni che avvengono sia a livello del DNA che del sistema di riparazione.

## **TRASPORTO ASSONALE DELLE RIP**

Numerosi studi sono stati condotti sugli effetti delle RIP sul sistema nervoso, con l'intenzione di sfruttarne eventuali caratteristiche per l'analisi dell'anatomia funzionale del sistema nervoso (vedi rassegna Contestabile e Stirpe 1993; Garcia *et al.*, 1993; vedi rassegna Wiley 1996; vedi rassegna Wiley e Kline 2000). È stato osservato che la ricina e le tossine correlate vengono trasportate per via retrograda lungo gli assoni, sino al pirenoforo, provocando la morte del neurone (trasporto suicida) (Harper *et al.*, 1980; Yamamoto *et al.*, 1983; Yamamoto *et al.*, 1984; vedi rassegna Yamamoto *et al.*, 1985; Wiley e Oeltman 1986; Paul e Devor 1987; Streit e Kreutzberg 1988; Henry *et al.*, 1987). Inoltre, la ricina è in grado di prevenire la rigenerazione delle fibre nervose e la formazione di neuroni (Brandner *et al.*, 1989; Bouldin *et al.*, 1990).

Il trasporto a ritroso lungo l'assone è stato osservato per tutte le RIP esaminate (Wiley *et al.*, 1982; Wiley e Stirpe 1987). Tuttavia solo la modeccina e la volkensina, quando iniettate nel sistema nervoso centrale, vengono trasportate in altre aree attraverso i neuroni che vi si proiettano. Per questo motivo queste due RIP bicateinarie sono considerate molto utili per lo studio dell'anatomia funzionale del sistema nervoso centrale. Per lo studio delle connessioni nervose è stata usata, con grande successo, una molecola ibrida composta dalla saporina-S6 legata ad un anticorpo anti-Thy1.1, antigene espresso sui neuroni del sistema nervoso centrale (Wiley *et al.*, 1989). Questi esperimenti hanno inoltre evidenziato che l'elevata specificità di localizzazione nel sistema nervoso centrale delle RIP, sia usate intatte, sia inserite in ibridi artificiali, dipende dal vettore, che nel caso delle molecole intatte è rappresentato dalle subunità B. Per cui è possibile ipotizzare l'utilizzo della subunità B come vettore per farmaci e fattori di crescita in siti specifici difficilmente raggiungibili.

## **RUOLO IN NATURA**

Forse il più intrigante interrogativo sulle RIP riguarda il loro ruolo in natura. Molte ipotesi sono state formulate, e il loro ampio numero indica che nessuna di esse è completamente convincente. È stato suggerito un ruolo difensivo contro patogeni, per la loro attività antivirale e antifungina, e contro i predatori, per la loro tossicità. L'elevata espressione in senescenza e in tessuti feriti e stressati suggerisce che esse potrebbero avere un ruolo nella patogenesi dell'apoptosi. La loro abbondanza nei semi potrebbe identificarle come proteine di deposito. Tutte queste ipotesi contengono una certa parte di verità, ma solo alcune possono essere applicate a tutte le RIP di tutti gli organismi che le producono, che variano dai batteri alle piante. D'altra parte, la loro estesa distribuzione suggerisce che possano avere un ruolo fondamentale, che conferisca un vantaggio evolutivo tale da giustificare la loro conservazione. Tutte le diverse proprietà potrebbero quindi essere soltanto fortunate e utili coincidenze.

### **1.5 TOSSICITA' DELLE RIP SULL'UOMO E SUGLI ANIMALI**

La tossicità dei prodotti vegetali contenenti RIP di tipo 2 è conosciuta da tempo. I sintomi indotti dall'avvelenamento da ricina sono stati descritti sino ad oggi in circa un migliaio di persone (Bálint, 1974). I segni patologici includono: sanguinamento delle membrane sierose, emorragia gastrica ed intestinale, fenomeni degenerativi del cuore, del fegato e del rene, danni alla milza ed ai linfonodi. Non si è a conoscenza invece di avvelenamenti fatali ad opera di una RIP di tipo 1, sebbene siano stati registrati segni di tossicità (febbre ed eruzioni cutanee) in casi di somministrazione di tricosantina al fine di indurre l'aborto (Lu e Jin, 1989) o in pazienti ammalati di AIDS (Byers *et al.*, 1990, 1994; Kahn *et al.*, 1990).

Le lesioni osservate negli animali in caso di avvelenamento da RIP di tipo 2 sono diverse da quelle prodotte da altri inibitori della sintesi proteica. Nel fegato degli animali intossicati con ricina i cambiamenti più precoci sono a carico del citoplasma e del nucleo delle cellule non parenchimali (cellule del Kupfer e

sinusoidali), le quali vengono progressivamente danneggiate fino a diventare necrotiche (Derenzini *et al.*, 1976; Battelli *et al.*, 1990). La degenerazione e la necrosi degli epatociti si sviluppano solo in seguito e probabilmente rappresentano la conseguenza della distruzione degli endoteli dei sinusoidi epatici e/o della liberazione di linfocine (IL-2 e TNF) da parte delle cellule del Kupfer. Licastro *et al.*, (1993) hanno dimostrato la capacità della ricina di indurre la produzione di TNF e di IL-1 $\beta$  da parte dei macrofagi umani. Queste citochine potrebbero contribuire alla patogenesi delle lesioni e all'insorgenza degli altri effetti osservati in seguito all'intossicazione con la ricina.

Negli animali avvelenati con modeccina o volkensina le lesioni più gravi si hanno a carico del fegato (Sperti *et al.*, 1979), mentre l'abrina nel ratto non altera né gli epatociti né le cellule non parenchimali, ma produce una severa necrosi a livello delle cellule acinose del pancreas (Barbieri *et al.*, 1979) e fenomeni apoptotici nel tessuto linfatico e nell'intestino (Griffiths *et al.*, 1987).

In uno studio comparativo sulle lesioni causate dalle RIP di tipo 1 (Battelli *et al.*, 1990) è risultato che gli organi costantemente coinvolti sono il fegato, il rene e la milza, nei quali è possibile osservare necrosi accompagnata talvolta da degenerazione grassa.

Nessuna significativa lesione è stata osservata in topi trattati con RIP di tipo 1 a dosi subletali (vedi rassegna Barbieri *et al.*, 1993), mentre lo stesso trattamento con la RTA induce necrosi lobulare del fegato, tracce di necrosi a livello dei tubuli prossimali del rene e lesioni degli acini sierosi delle ghiandole salivari e del pancreas (vedi rassegna Jansen *et al.*, 1988), osservabili a 9 giorni dalla somministrazione.

## **1.6 APPLICAZIONI DELLE RIP**

### **IMPIEGO IN AGRICOLTURA**

In agricoltura le RIP vengono usate per produrre piante transgeniche resistenti a virus e batteri. Ciò si ottiene trasfettando il gene che codifica per la RIP di interesse nel genoma della pianta che si vuole trasformare. Un esempio è

rappresentato dall'introduzione del gene della diantina (tabella 1) nella pianta *Nicotiana bentamiana* per renderla resistente al virus *African Cassavan Mosaic Virus*. Per avere l'espressione della RIP solo in seguito ad infezione, il gene della diantina è stato posto sotto il controllo di un forte promotore virale. Questo permette l'espressione della RIP soltanto in presenza del virus in modo da bloccarne la propagazione. La resistenza inserita è molto specifica dal momento che l'infezione con altri virus della stessa famiglia non induce l'espressione della RIP (Hong *et al.*, 1996). Le RIP di tipo 1 danneggiano le piante transgeniche che le producono, mentre non provocano danni nelle piante autologhe poichè la sequenza segnale della RIP prodotta in forma inattiva la indirizza verso un determinato compartimento vacuolare o all'esterno della cellula in modo da mantenerla separata fisicamente dai ribosomi.

Anche le RIP di tipo 2 sono state usate per indurre resistenze specifiche. Per esempio, il gene codificante per la ricina è stato trasfettato in piante di tabacco, e l'espressione della proteina attiva, correttamente processata, non ha dato modificazioni del fenotipo (Tagge *et al.*, 1996). Questo perchè la ricina è solo moderatamente attiva sui ribosomi del tabacco e in questo caso, così come nella pianta di origine, essa viene compartimentalizzata per tenerla lontano dai ribosomi della pianta transgenica (Van Damme *et al.*, 2001).

## **IMPIEGO IN TERAPIA: LE IMMUNOTOSSINE**

Le tossine, pur possedendo un meccanismo di uccisione delle cellule altamente efficiente, mancano di specificità. Per eliminare selettivamente le cellule indesiderate si può ricorrere all'ausilio di un anticorpo monoclonale, attraverso la costruzione di un'immunotossina.

La prima generazione di immunotossine è stata realizzata legando ad anticorpi monoclonali molecole di tossina intera, con la speranza che l'avidità e la specificità della porzione anticorpale riuscissero a conferire al coniugato una tossicità specifica per il bersaglio cellulare molto maggiore rispetto alla tossicità aspecifica data dalla catena B (Molten e Cooperband, 1970; vedi rassegna Thorpe e Ross, 1982). Nonostante l'elevata efficienza di queste immunotossine, la

tossicità aspecifica riscontrata ne ha impedito l'impiego e ha reso necessaria la ricerca di metodi per bloccare, modificare o eliminare la catena lectinica. Il blocco della porzione in grado di legare il galattosio nella catena B è stato ottenuto in vari modi:

- a. per mezzo di contemporaneo uso, *in vitro*, di un eccesso di lattosio o di galattosio nel mezzo;
- b. mediante reazione con particolari ligandi reattivi, ottenuti modificando chimicamente oligosaccaridi triantennari (Lambert *et al.*, 1988);
- c. mediante legame chimico con anticorpi monoclonali, che impediscono stericamente il legame con gli oligosaccaridi.

Un numero molto elevato di immunotossine è stato costruito con la sola catena A della ricina. Anche in questo caso sono stati riscontrati alcuni problemi, soprattutto connessi alla difficoltà e alla pericolosità della sua purificazione e alla tossicità aspecifica, dovuta al riconoscimento dei residui di mannosio presenti sulla catena A da parte di recettori presenti su molti tipi cellulari. Per ovviare ai problemi di aspecificità, diverse immunotossine sono state preparate con la catena A deglicosilata. Questo obiettivo è stato ottenuto sia deglicosilando la RIP enzimaticamente o chimicamente (Blakey *et al.*, 1986, 1987; Ghetie *et al.*, 1990, 1991-b, 1995; Foxwell *et al.*, 1985, 1987) sia mediante la produzione di catena A ricombinante (Embleton *et al.*, 1991; Krek *et al.*, 1995).

Molte RIP di tipo 1 sono state utilizzate per la costruzione di immunotossine. L'impiego di RIP di tipo 1 nella costruzione di immunotossine presenta diversi vantaggi rispetto alla catena A della ricina:

- sono più stabili durante l'isolamento e l'attività enzimatica è più resistente ai diversi trattamenti chimici;
- la loro preparazione e purificazione è sicura per l'operatore;
- essendo numerose ed immunologicamente distinte tra loro, è possibile aggirare la risposta immunitaria, almeno contro la tossina, mediante somministrazione sequenziale di immunotossine costruite con differenti RIP.

In diversi casi le immunotossine contenenti RIP di tipo 1 si sono dimostrate più attive di quelle contenenti la RTA (Tazzari *et al.*, 1988; Bolognesi *et al.*, 1992).



## 1.7 RICINA E ALTRE RIP COME ARMI BIOLOGICHE

Essendo la ricina un potente veleno facile da ottenere, è stata usata storicamente per volontà suicida e omicida, e ci sono timori che possa essere usata come arma biologica per guerre o terrorismo.

Essa può facilmente essere spruzzata nell'aria come aerosol o in polvere; per questo tipo di avvelenamento sono stati condotti parecchi studi nel ratto, che hanno evidenziato la formazione di un edema polmonare, con distruzione acuta degli alveoli e necrosi dell'epitelio delle vie aeree inferiori. Una buona protezione contro l'intossicazione dovuta a inalazione di ricina può essere ottenuta tramite vaccinazione (Griffiths *et al.*, 1995; Kende *et al.*, 2002) o attraverso la somministrazione di anticorpi (Hewetson *et al.*, 1993). Inoltre, recentemente è stato sviluppato un metodo basato sull'utilizzo di un biosensore per una rapida rilevazione della ricina e di altre tossine (Lubelli *et al.*, 2006).

## 1.8 IMPIEGHI DELLE IMMUNOTOSSINE

### LE NEOPLASIE

L'impiego delle immunotossine nella terapia dei tumori umani presenta diversi vantaggi rispetto alla chemioterapia tradizionale. Infatti, le immunotossine:

1. possono agire in qualunque momento del ciclo cellulare della cellula bersaglio;
2. mostrano un'azione non strettamente dose dipendente;
3. sono attive su un segmento di rRNA altamente conservato, rendendo difficile quindi l'insorgenza di fenomeni di resistenza.

Immunotossine a base di RIP sono state impiegate *in vivo* per la terapia sperimentale di tumori ematologici quali leucemie, linfomi di tipo T e B, di tipo non linfocitario e leucemia eritroide (Bolognesi *et al.*, 1998; Goldmacher *et al.*, 1994)

Le immunotossine e in particolare quelle contenenti ricina, in cui è stata bloccata la catena B, sono state usate anche per studiare tumori animali solidi

dimostrandosi molto efficaci (Wiels *et al.*, 1984). Purtroppo la somministrazione sistemica delle immunotossine nella terapia dei tumori solidi umani ha dato scarsi risultati. In questo caso i problemi sono molteplici:

- degradazione e rapida eliminazione delle immunotossine;
- ridotta accessibilità al tumore solido se la vascolarizzazione è scarsa;
- modificazioni e perdita di antigeni da parte delle cellule maligne;
- produzione di antigeni solubili da parte delle cellule neoplastiche che neutralizzano l'immunotossina.

Inoltre questo tipo di terapia, come la chemioterapia, presenta forti effetti collaterali sistemici fra cui la *capillary leak* sindrome (aumento della permeabilità capillare che è l'effetto più grave), febbre, affaticamento, dispnea, mialgia, nausea e la possibilità di una risposta immunitaria sia contro l'anticorpo eterologo che verso la RIP.

Finora la sperimentazione non ha dato risultati incoraggianti, probabilmente perché tutti i pazienti trattati erano allo stadio terminale della malattia, con grandi masse tumorali e gravi complicazioni. Utilizzando tecniche *ex-vivo* i risultati sono stati migliori e in alcuni casi si è verificata una completa guarigione (Bolognesi *et al.*, 2005).

## I TRAPIANTI

Nel trattamento del midollo osseo sia autologo che eterologo, esistono già sperimentazioni cliniche che prevedono l'uso di immunotossine, data la loro buona attività *in vitro*, per l'eliminazione dei linfociti B e T. Il trapianto di midollo eterologo viene effettuato nel trattamento di patologie del sangue come anemia aplastica, malattia da immunodeficienza, leucemie e linfomi. In questi casi è necessario bloccare i linfociti T competenti del donatore, affinché non ci sia reazione contro le cellule del ricevente (reazione graft versus host). Nell'autotrapianto invece il midollo del paziente viene re infuso dopo rimozione *in vitro* delle cellule neoplastiche mediante incubazione con immunotossine specifiche dirette e indirette (Brust *et al.*, 1987). Ad esempio la catena A della

ricina è molto usata per costruire immunotossine adibite al *purging* del midollo (Vooijs *et al.*, 1995).

In molti casi il trapianto autologo ha efficacemente rimosso le cellule maligne, ma la maggior parte dei pazienti ha avuto una successiva ricaduta, probabilmente causata da cellule maligne ancora presenti nell'organismo.

## LE MALATTIE AUTOIMMUNI

Per la terapia delle malattie autoimmuni è possibile costruire dei coniugati contenenti RIP che eliminano i linfociti che reagiscono contro il *self*.

La terapia proposta è di due tipi:

1. uso di un coniugato formato dalla RIP e dall'anticorpo indirizzato contro l'antigene della cellula bersaglio;
2. uso di un coniugato formato dalla RIP e dall'antigene contro cui si scatena la reazione autoimmune.

Sono stati preparati diversi coniugati della ricina. Un esempio è l'associazione della ricina con la tireoglobulina umana da usare nella patologia della tiroidite di Hashimoto (in cui si esprimono alti livelli di anticorpi che riconoscono gli antigeni *self* della tiroide). Un ulteriore esempio è un coniugato fra ricina e acetilcolina per la cura della miastenia gravis (in cui si producono alti livelli di anticorpi che distruggono il recettore nicotinico per l'acetilcolina che si trova nella membrana post sinaptica delle placche neuromuscolari) (Hott *et al.*, 1998).

## INFEZIONI VIRALI

Uno dei campi di ricerca più interessanti nella cura delle infezioni virali è quella rivolta alla lotta contro l'AIDS. Effetti inibitori sull'infezione da HIV-1 sono stati osservati usando RIP di tipo 1, immunotossine dirette contro l'antigene cellulare CD4<sup>+</sup> (delle cellule che sono bersaglio del virus), o coniugati specifici rivolti contro proteine virali come la gp120, gp41 e gp160, che vengono espressi sulla superficie delle cellule infette.

Sono stati sperimentati coniugati composti dalla catena A della ricina e il CD4 ricombinante a cui si lega la gp120 del virus. Con questo tipo di approccio si ottiene un'effettiva inibizione della replicazione virale, ma a livello terapeutico i risultati sono scadenti perché la gp120 varia di continuo e questo antigene è anche liberato nel mezzo sottraendo alla tossina il suo vero bersaglio. Utilizzando invece una immunotossina formata dalla catena A della ricina contro la gp41 del virus l'efficacia terapeutica aumenta poiché quest'ultima è una proteina più stabile. In ogni caso, sono stati osservati effetti collaterali importanti (Pincus *et al.*, 1991 e 1996) segno che la sperimentazione è ancora lunga ed impegnativa.

## IMMUNOTOSSINE ANTI-ACHR

La possibilità di eliminare uno specifico tipo cellulare ha portato all'utilizzo delle immunotossine in diverse applicazioni, sia sperimentali che cliniche.

Per il trattamento degli spasmi muscolari focali è stata sviluppata un'immunotossina contenente ricina e l'anticorpo monoclonale mAb35, specifico per la subunità del recettore dell'acetilcolina (Hott *et al.*, 1998). Questa immunotossina è stata saggiata *in vivo* nei muscoli extraoculari di coniglio, mostrando un effetto miotossico dose dipendente, associato ad una cospicua reazione infiammatoria. L'infiammazione osservata nel sito di iniezione è dovuta in parte alla necrosi prodotta e in parte all'effetto della catena B della tossina, di per sé in grado di indurre il rilascio di citochine (Christiansen *et al.*, 2000). Dopo 105 giorni dal trattamento è ancora evidente una sostanziale diminuzione della massa muscolare, con riduzione della forza contrattile del 33-50% (Christiansen *et al.*, 2003). A distanza di un anno, grazie alla rigenerazione muscolare visibile già dopo due settimane dall'iniezione, il numero di fibre e la sezione del muscolo sono tornati nella norma anche se con una pronunciata eterogeneità cellulare (Christiansen *et al.*, 2002). Risultati analoghi sono stati ottenuti nel muscolo orbicolare per il trattamento del blefarospasmo (Harrison *et al.*, 2004). Un'immunotossina contenente saporina-S6 (tabella 1) e l'anticorpo monoclonale mAb73, diretto contro la sub unità dell'AchR, ha indotto apoptosi/necrosi muscolare senza evidenti segni di infiammazione (Campos *et al.*, 2002).

## 1.9 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Nel corso degli anni sono stati condotti molti studi per conoscere fino in fondo la biologia delle RIP, tuttavia ancora oggi rimangono tanti punti da chiarire. La prima considerazione emerge dai recenti risultati ottenuti circa la loro distribuzione, sembra infatti che le RIP di tipo 2 siano più diffuse di quanto si sappia e che esistano altre tossine, come l'aralina, presenti in piante considerate fino a poco tempo fa non tossiche.

L'osservazione che le RIP siano in grado di legare diverse proteine ribosomiali e che la loro attività possa essere stimolata da differenti tRNA, apre nuove strade verso la comprensione del meccanismo d'azione delle RIP.

L'azione sul DNA e sugli altri substrati nucleotidici rimane ancora da chiarire. È possibile che il danno al DNA abbia un ruolo sull'attività antivirale, apoptotica e trasformante esibita dalle RIP.

La tossicità delle RIP è anche dovuta alla capacità di attivare alcune chinasi, che a loro volta inducono il rilascio di citochine (Licastro *et al.*, 1993); infatti, è stato dimostrato che l'anomalo rilascio di particolari citochine rappresenta un potenziale elemento di sviluppo di malattie come il cancro, l'AIDS, la psoriasi, la sclerosi multipla e l'artrite. L'attivazione delle chinasi può essere anche coinvolta nell'attività antivirale delle RIP, poiché alcune citochine inibiscono la replicazione virale.

La sfida maggiore nello studio delle RIP è quella di capire il loro ruolo in natura, requisito fondamentale per poter spiegare la loro conservazione nel corso dell'evoluzione. Sulla base della loro attività antivirale e antifungina, è stato suggerito un possibile ruolo delle RIP contro i patogeni. L'aumento della loro espressione in concomitanza della senescenza e della presenza di tessuti lesi o stressati, suggerisce un possibile ruolo delle RIP nella patogenesi dell'apoptosi e la loro grande abbondanza nei semi fa pensare ad esse come proteine di deposito. Queste ipotesi sono tutte ragionevoli, ma sono ristrette alle RIP di origine vegetale.

Gran parte dello studio sulle RIP è finalizzato alle loro possibili applicazioni.

In agricoltura, per esempio, le RIP possono essere usate per indurre maggiore resistenza virale nelle piante, e gli eventuali effetti tossici delle RIP potrebbero essere limitati trasfettando la pianta con una RIP appropriatamente mutata, in modo che l'organismo transgenico non celi nessun rischio per l'uomo. Inoltre, nel caso di piante commestibili è necessario considerare il livello di RIP presente nei tessuti vegetali, per minimizzare i rischi di reazioni allergiche.

Un'ulteriore applicazione delle RIP è quella in campo medico, che consiste nell'utilizzazione delle immunotossine a scopo farmacologico. Studi clinici con immunotossine hanno però rilevato evidenti segni di epatotossicità (vedi rassegna Vitetta e Thorpe, 1991). È stata riportata anche l'insorgenza di una sindrome da aumentata permeabilità vascolare o VLS (*vascular leak syndrome*) (vedi rassegna Byers e Baldwin, 1988) e di danni a livello renale associati a sindrome uremica emolitica. Tuttavia, studi condotti sull'uso delle immunotossine su quattro pazienti affetti da linfoma di Hodgkin ha portato ad una sostanziale riduzione della massa tumorale (Falini et al., 1992). Esiste, dunque, la possibilità che le immunotossine possano essere utilizzate nella terapia antitumorale con le dovute precauzioni (vedi rassegna Stirpe e Battelli, 2006).

## **Capitolo 2**

# **Scopo della ricerca**

Le RIP (*ribosome inactivating proteins*) sono proteine di origine prevalentemente vegetale, capaci di inibire la sintesi proteica cellulare depurinando l'rRNA della subunità 60S del ribosoma e impedendo in tal modo la sua interazione con i fattori di allungamento coinvolti nella traduzione. Inoltre posseggono attività polinucleotide:adenina glicosilasi, cioè la capacità di depurinare altri substrati, in particolare il DNA, le cui implicazioni biologiche sono tutt'ora allo studio.

Le RIP vengono divise, in base alla loro struttura, in RIP di tipo 1 e di tipo 2. Le RIP di tipo 1, tra cui è classificata la saporina, sono costituite di norma da un'unica catena polipeptidica enzimaticamente attiva; mentre le RIP di tipo 2, tra cui la lanceolina e la stenodactilina, sono formate da due tipi di catene, uno con attività enzimatica identica alle RIP di tipo 1 (catena A) ed uno ad attività lectinica (catena B), che permette il legame della proteina alla superficie cellulare. Tra le RIP di tipo 2 vengono classificate tossine molto potenti, tra cui la volkensina e la ricina; tuttavia, appartengono a questa famiglia anche proteine che, hanno una bassa tossicità per le cellule e per gli animali, simile a quella esercitata dalle RIP di tipo 1.

Come approfondito nell'introduzione, le RIP hanno molteplici aspetti applicativi. L'applicazione più promettente e più studiata prevede la coniugazione delle RIP ad anticorpi monoclonali, per la costruzione di immunotossine. Questo tipo di coniugati permette di colpire in modo mirato bersagli specifici indesiderati come cellule tumorali o infettate da virus. Le RIP di tipo 1 e la catena A delle RIP di tipo 2 risultano altamente citotossiche quando coniugate a vettori che consentano loro di entrare nella cellula bersaglio. Le immunotossine hanno diversi campi di applicazione, per esempio in terapia sperimentale, anche se ad oggi sussistono diversi problemi. È stato proposto il loro utilizzo come farmaci antitumorali nella malattia minima residua e nel trapianto autologo per il *purging* da cellule tumorali. Le immunotossine potrebbero inoltre avere impiego come immunosoppressori nelle malattie autoimmuni e nel trapianto eterologo di midollo per prevenire la GVHD



Oggetto di questa ricerca è stato lo studio della citotossicità, interazione cellulare e *routing* intracellulare di saporina, lanceolina e stenodactilina. La ricerca si è sviluppata principalmente lungo due filoni:

1. studio del traffico intracellulare della saporina;
2. studio delle caratteristiche citotossiche, interazione cellulare e *routing* intracellulare di lanceolina e stenodactilina.

Lo studio del meccanismo d'ingresso e del destino intracellulare della saporina è di particolare interesse da quando questa RIP monocatenaria è utilizzata per la costruzione di immunotossine a scopo farmacologico, per il *targeting* selettivo di cellule bersaglio.

Le RIP monocatenarie sono particolarmente usate nella costruzione di immunoconiugati per la loro bassa tossicità aspecifica e per la scarsità di effetti collaterali dovuti alla somministrazione in vivo delle immunotossine contenenti RIP di tipo 1. Inoltre, le RIP monocatenarie si sono dimostrate, in numerosi casi, più stabili ed efficaci della catena A delle RIP bicateinarie come, per esempio, la dgRA (Bolognesi *et al*, 1992; Tazzari *et al*, 1992), con un'ottima resistenza ai processi di derivatizzazione necessari per la coniugazione.

La conoscenza dell'interazione delle RIP con le cellule umane e in particolare della citotossicità è un prerequisito indispensabile per l'uso in terapia sperimentale di questi enzimi depurinanti di origine vegetale.

Questi motivi giustificano l'interesse rivolto allo studio della saporina e in modo particolare alle modalità di ingresso nella cellula, alla sua localizzazione negli organuli subcellulari e al *routing* intracellulare della RIP. Questo tipo di ricerca può inoltre aiutare a comprendere le modalità di veicolazione delle proteine nei vari compartimenti intracellulari. Infatti, la saporina durante il suo *routing* intracellulare sfrutta i normali meccanismi di trasporto vescicolare presenti nella cellula.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti su cellule HeLa, poiché questa linea è largamente usata e permette di confrontare i nostri risultati con quelli ottenuti con altre sostanze, in particolare la ricina.

Per studiare il *routing* intracellulare della saporina sono state utilizzate due diverse tecniche:

- a) immunofluorescenza indiretta, abbinata alla microscopia confocale;
- b) microscopia elettronica, sia utilizzando la saporina coniugata direttamente all'oro colloidale (*pre-embedding*), sia usando la RIP non coniugata in un metodo indiretto (*post-embedding*).

Il primo approccio usato è l'immunofluorescenza, che permette di farsi un'idea iniziale delle modalità sperimentali da utilizzare, poiché il risultato è più facile da ottenere, ma non raggiunge il grado di definizione della microscopia elettronica. L'uso del metodo indiretto garantisce l'assenza di alterazioni del percorso, che potrebbero essere determinate dal legame col fluorocromo, amplifica il segnale ma non consente un'analisi quantitativa. Attraverso l'immunofluorescenza indiretta abbiamo studiato la progressione temporale della distribuzione intracellulare della saporina e la sua eventuale colocalizzazione con il RER e con l'apparato del Golgi. L'uso del microscopio confocale ha permesso di formulare alcune ipotesi, che sono state ulteriormente vagliate grazie all'utilizzo del microscopio elettronico.

La microscopia elettronica, grazie all'elevata risoluzione, permette una chiara osservazione dell'aspetto ultrastrutturale della cellula e rende possibile la localizzazione intracellulare anche di una sola molecola proteica.

Entrambe le tecniche usate (diretta e indiretta) permettono di dettagliare il percorso seguito dalla RIP nel suo passaggio dalla membrana plasmatica verso il citosol della cellula.

Inoltre abbiamo indagato sulla possibilità che la saporina, seppur in piccole quantità, possa raggiungere il nucleo ed esercitare sul DNA la propria attività enzimatica.

Il secondo filone di ricerca ha riguardato lo studio delle RIP estratte da *A. lanceolata* e *A. stenodactyla*, purificate nel nostro laboratorio (Pelosi *et al.*, 2005; Stirpe *et al.*, 2007) e denominate rispettivamente lanceolina e stenodactilina, soffermandosi, in particolar modo, sulle caratteristiche citotossiche e sul *routing* intracellulare.

Un obiettivo preliminare di questa ricerca è stato quello di indagare sulla capacità citotossica delle due RIP bicatenarie, attraverso la valutazione dell'inibizione della sintesi proteica e della perdita di vitalità cellulare.

Poiché le due RIP bicatenarie sono risultate estremamente citotossiche rispetto alle altre proteine della stessa famiglia (tra cui la volkensina e la ricina), sono stati eseguiti saggi che permettono di studiare i meccanismi di intossicazione e il *routing* intracellulare della lanceolina e dalla stenodactilina, con lo scopo di spiegare l'elevata citotossicità riscontrata. Inoltre è stata valutata l'eventuale capacità apoptotica delle due RIP, sia per approfondire lo studio sulla citotossicità, sia per le implicazioni rispetto alla possibilità di un loro utilizzo farmacologico.

L'approfondimento delle conoscenze sulla biologia di queste due RIP, è di particolare interesse in quanto queste proteine potrebbero essere utilizzate a scopo farmacologico, con modalità che favoriscano l'apoptosi rispetto alla necrosi. Per esempio, immunotossine contenenti RIP sono state utilizzate in trattamenti loco-regionali, come nel trattamento del blefarospasmo e di disturbi oculo-facciali (Campos *et al.*, 2002; Harrison *et al.*, 2004). Inoltre, sfruttando la loro citotossicità e il trasporto retrogrado assonale (Monti *et al.*, 2007), potrebbero essere impiegate nello studio della fisiologia del sistema nervoso (dalla rassegna Contestabile e Stirpe, 1993).

## **Capitolo 3**

# **Materiali e Metodi**

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 RIP

I semi di *Saponaria officinalis* sono stati forniti dall'Azienda Regionale delle Foreste della Regione Emilia Romagna, Casola Romagna, Ravenna, Italia. La saporina-S6 (indicata in seguito come saporina), è stata purificata come descritto da Barbieri e collaboratori nel 1987 e successivamente cromatografata, per eliminare i contaminanti a basso peso molecolare, in tampone sodio fosfato 5 mM contenente NaCl 0,14 M pH 7,5 (PBS) su Sephacryl S100 (GE Healthcare, Milano, Italia). Il grado di purezza era del 99 %, come rilevato mediante HPLC in fase inversa (Parente *et al.*, 1993).

Le RIP lanceolina, stenodactilina e volkensina sono state purificate rispettivamente da *Adenia lanceolata*, *Adenia stenodactyla* e *Adenia volkensii* (appartenenti alla famiglia delle Passifloraceae) (Pelosi *et al.*, 2005) e preparate come descritto da Stirpe e collaboratori nel 1985. Le piante sono state fornite da Exotica Botanical Rarities, Erkelenz-Golkrath, Germania, e sono state conservate nella serra del Giardino Botanico dell'Università di Bologna. Le RIP sono state marcate con  $^{125}\text{I}$  come descritto da Freker e Speck, 1978.

#### 3.1.2 COLTURE CELLULARI

Tutti gli esperimenti sono stati condotti usando la linea cellulare HeLa. Tutti i componenti del mezzo di colture cellulare sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Il colorante Tripan Blu, fornito dalla Bio Whittaker, è stato usato per valutare la vitalità delle cellule. Per le prove di citotossicità sono state utilizzate L- $^3\text{H}$ ]leucina proveniente dalla G.E. Healthcare, Milano, Italia. Il materiale sterile da coltura era della Falcon fornito da Sacco, Cadorago, Como., Lier, Norvegia.

### 3.1.3 ANTICORPI

L'anticorpo policlonale di coniglio anti-saporina è stato gentilmente fornito dalla Prof. Paola Strocchi (Strocchi *et al.*, 1992), Dipartimento di Farmacologia, Università di Bologna. L'albumina di siero bovino (BSA), e il 1,4-diazobisciclo-[2.2.2]-ottano (DABCO) sono stati forniti dalla Sigma (S. Louis, MO, U.S.A.). Il Mowiol 4-88 era della ditta Aldrich-Chemie (Steinheim, Germania). L'anticorpo secondario anti-coniglio IgG coniugato a isotiocianato di fluorescina (FITC) era della ICN ImmunoBiologicals (Lisle, Ill). L'anticorpo policlonale anti-*mouse* IgG coniugato con Cy5 è stato fornito dalla Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pa). L'anticorpo monoclonale di topo anti-GM130 era della BD Transduction Laboratories (Heidelberg, Germania), mentre l'anticorpo monoclonale di topo anti-BiP è stato fornito dalla Sigma.

### 3.1.4 KIT

Per la valutazione dell'apoptosi, in seguito ad intossicazione delle cellule con le RIP, è stato utilizzato il kit luminescente Caspase-Glo™ 3/7 Assay della Promega Corporation, Wisconsin, USA. La vitalità cellulare è stata anche valutata mediante il kit colorimetrico CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay della Promega Corporation. Il CellTiter-96 Aqueous One Solution Reagent contiene un composto di sali di tetrazolio [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, composto di tetrazolio; MTS] e il PES (phenazine ethosulfate) che funge da accettore di elettroni.

Il saggio Endo IV, utilizzato per la determinazione dell'attività enzimatica della saporina sul DNA, è stato fornito dalla Trevigen (Gaithersburg, Maryland, U.S.A.).

### 3.1.5 REATTIVI

Il liquido di scintillazione per soluzioni acquose era il Ready-Gel della Beckman Instruments, Fullerton U.S.A. I reagenti, i gel per l'elettroforesi e gli standard di peso molecolare sono stati acquistati dalla GE Healthcare. La brefeldina A, il dynasore e la clorochina, usati per lo studio del *routing* intracellulare di lanceolina e stenodactilina, sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich. La tripsina e l' $\alpha$ -chymotripsina usate per valutare la resistenza delle RIP alla degradazione proteasica e il *Proteasome inhibitor II* sono stati forniti dalla Calbiochem, San Diego, CA, USA, come anche l'inibitore del proteasoma II. Le proteasi sono state disciolte in HCl 1 mM, portate alla concentrazione di 1 mg/ml e, se non usate al momento, immediatamente conservate a -20 °C. L'oro colloidale (diametro 5 nm) proveniva dalla SPI, West Chester, PA, U.S.A. L'anticorpo secondario anti coniglio IgG marcato con oro colloidale del diametro di 10 nm è stato fornito dalla GE, Healthcare. La glutaraldeide è stata fornita dalla Merck. L'ossido di propilene, la resina araldite, la DDSA EM, il tris (dimetil-aminometil) fenolo, l'acetato di uranile sono stati forniti dalla Fluka (Buchs SG, Svizzera). Il citrato di piombo era della ditta BDH (Milano, Italia). Tutti gli altri reagenti sono stati forniti dalla Merck (Darmstadt, Germania), dalla ditta Carlo Erba (Milano, Italia) e dalla Sigma.

Tutti i materiali utilizzati nel corso della preparazione dei campioni per la microscopia elettronica, sono stati gentilmente concessi dal Dipartimento di Anatomia Patologica, Ospedale Sant'Orsola-Malpighi di Bologna.

### 3.1.6 STRUMENTI

Le cellule sono state fatte crescere in un incubatore HeraCell Haereus (Hanau, Germania), alla temperatura di 37 °C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Il *cell-harvester* proveniva dalla Skatron Instrument, Lier, Norvegia.

Il microscopio confocale Radiance 2000 e il *software* LaserPix sono stati forniti dalla BioRad (Hercules, CA, U.S.A.). Per determinare la concentrazione delle molecole proteiche è stato utilizzato uno spettrofotometro modello UVICON 860 della Kontron Instruments, Milano, Italia. Il  $\beta$ -counter utilizzato per l'analisi dell'incorporazione della radiattività è stato fornito dalla Beckman Instruments, Palo Alto, CA, U.S.A.. L'analisi morfologica delle cellule in coltura è stata effettuata utilizzando una fotocamera Moticam 1000 della Motic (Xiamen, Cina). Per le letture della luminescenza, è stato utilizzato il luminometro Fluoroskan Ascent FL della Labsystem, Finlandia. L'ultramicrotomo è stato fornito dalla Reichert (Australia), mentre il microscopio elettronico era della Philips (Eindhoven, Olanda). L'acqua utilizzata è stata preparata con un apparecchio Milli-Q (Millipore, Milford, MA USA) ed è stata prelevata ad un valore di resistività di 15 M $\Omega$  alla sorgente. Per l'elettroforesi è stato utilizzato il Phastsystem della GE Healthcare. Per la lettura a 490 nm, è stato utilizzato il lettore Microtiter Multiskan EX.

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software XLSTAT-Pro, versione 6.1.9 (Addinsoft, 2003).

Il microscopio elettronico, è stato gentilmente concesso dal Dipartimento di Anatomia Patologica, Ospedale Sant'Orsola-Malpighi di Bologna.



## 3.2 METODI

### 3.2.1 INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA SU LISATO DI RETICOLOCITI DI CONIGLIO

L'attività biologica di lanceolina e stenodactilina sulla sintesi proteica è stata inizialmente valutata in un sistema cell-free, utilizzando il lisato di reticolociti di coniglio. Diluizioni scalari di lanceolina e stenodactilina (da 20 a 1 µg/ml) sono state ridotte con 50% 2-mercaptoetanololo per 10 minuti a 37°C seguita da 2 minuti in ebollizione. In seguito, 25 µl di ciascuna diluizione di RIP sono stati aggiunti a 12.5 µl di una miscela di reazione (contenente 10 mM tampone Tris/HCl pH 7.4, 100 mM ammonio acetato, 2 mM magnesio acetato, 1 mM ATP, 0.2 mM GTP, 15 mM creatinfosfato, 12 µU di creatinchinasi, 0.05 mM aminoacidi (senza leucina), 0.75 µCi L-[4,5-3H] leucina) e a 25 µl di lisato di reticolociti di coniglio (preparato come descritto da Allen e Schweet, 1962). Dopo un'incubazione di 5 minuti a 28 °C in agitazione, la reazione è stata bloccata con 1ml di KOH 0.1M; sono stati poi aggiunti 25 µl di perossido di idrogeno per decolorare il campione, quindi 1ml di acido tricloracetico (TCA) 20% per precipitare le proteine. Il precipitato proteico è stato raccolto su filtri Whatman GF/C. I filtri, lavati 3 volte in TCA 5%, vengono trasferiti successivamente in fiale da scintillazione con 5 ml di liquido di scintillazione Ready-Gel (Beckman) contenente lo 0.7% di acido acetico, per abbattere l'eventuale chemiluminescenza. La radioattività incorporata nelle proteine neosintetizzate è stata misurata mediante lettura al  $\beta$ -counter.

La concentrazione di RIP che inibisce del 50% la sintesi proteica (IC<sub>50</sub>) viene calcolata mediante l'analisi della regressione lineare in relazione all'incorporazione di leucina radiattiva nei campioni di controllo, incubati senza l'aggiunta di RIP.

### 3.2.2 COLTURE CELLULARI

Le cellule HeLa sono state coltivate in fiasche da 25 cm<sup>2</sup>, in terreno RPMI 1640 contenente siero bovino fetale (FBS) al 10%, scomplementato per 30 minuti a 56 °C, 2 mM L-Glutammina e antibiotici, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina (mezzo completo).

Al raggiungimento della confluenza (circa 72 ore dopo la semina) le cellule sono state lavate con PBS, staccate dal fondo con tripsina 500 mg/L-EDTA 200 mg/L per 5 minuti a 37 °C e risospese in mezzo di coltura completo. Le cellule vengono poi centrifugate a 1.000 rpm per 5 minuti e il *pellet* ottenuto, viene risospeso in mezzo completo. La conta cellulare è basata sul metodo dell'esclusione vitale del colorante Tripán Blue.

### 3.2.3 ESPERIMENTI BASATI SULL'INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA CELLULARE

Per valutare l'inibizione della sintesi proteica cellulare, le cellule HeLa vengono seminate in piastre da 24 pozzi (40.000 cellule/pozzo) in 1ml di terreno completo e dopo circa 18 ore dalla semina, vengono incubate in presenza della RIP.

Nel caso della saporina, le cellule sono state esposte a concentrazioni scalari di RIP da 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-5</sup> M, mentre per le RIP bicatinarie il *range* di concentrazione usato era da 10<sup>-15</sup> a 10<sup>-9</sup> M. In tutti i casi il trattamento è di 24 ore in incubazione continua, a 37 °C.

Al termine dell'incubazione, dopo aver aspirato il mezzo, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 250 µl di terreno privo di leucina e FBS, ma contenente 2 µCi/ml di L-[4,5-<sup>3</sup>H]leucina (attività specifica 85 Ci/nmol) e incubati a 37 °C. Dopo 4 ore, le proteine vengono dapprima precipitate, con TCA 10% per 10 minuti, poi lavate con TCA 5% e disciolte in KOH 0.1 N per 10 minuti a 37 °C. La radioattività incorporata dalle cellule viene misurata al β-counter, in presenza di liquido di scintillazione.

I risultati vengono espressi come percentuale di incorporazione di leucina radioattiva rispetto alle colture di controllo, incubate in assenza di RIP.

La capacità di inibizione della sintesi proteica è stata valutata in presenza di dynasore. A questo scopo, le cellule sono state pre-trattate per 30 minuti a 37 °C con dynasore (10 µM). Le RIP sono state aggiunte direttamente nei pozzi alla concentrazione finale di  $10^{-10}$  M e i campioni cellulari sono stati incubati per 3 ore prima di procedere con l'aggiunta della leucina radioattiva, che è stata lasciata per 1 ora a contatto con le cellule.

Un esperimento analogo è stato condotto per valutare l'effetto della brefeldina A e della clorochina sulle capacità citotossiche di lanceolina e stenodactilina. Le cellule sono state incubate per 1 ora a 37 °C con brefeldina A (10 µM) o con clorochina (100 µM). In seguito, i pozzetti sono stati lavati e le RIP ( $10^{-10}$  M) sono state aggiunte in mezzo fresco. La sintesi proteica è stata valutata dopo 4 ore di trattamento (3 ore in presenza delle RIP e 1 ora di incubazione con leucina radioattiva), come descritto precedentemente.

### **3.2.4 ESPERIMENTI DI MICROSCOPIA A FLUORESCENZA**

#### **TRATTAMENTO DELLE CELLULE E INTOSSICAZIONE CON SAPORINA**

Le cellule HeLa (40.000/pozzo) sono state seminate su vetrini rotondi posti sul fondo di piastre da 24 pozzi in 1 ml di terreno completo, 24 ore prima del trattamento. Le cellule sono state intossicate con saporina  $10^{-5}$  M per 20 minuti a 37 °C e allo scadere del tempo lavate e incubate per tempi crescenti (ulteriori 0, 20, 40 minuti) a 37 °C in assenza di saporina.

Dopo il trattamento, le cellule vengono lavate tre volte con terreno di coltura privo di siero a 0 °C, e fissate per 30 minuti a 30 °C, con *p*-formaldeide 1% in PBS. Prove preliminari hanno accertato che questa procedura di fissazione è sufficiente per stabilizzare le strutture cellulari e permette di mantenere immutate le caratteristiche antigeniche, indispensabili per il *test* di immunofluorescenza.

Dopo due lavaggi con PBS, le cellule vengono permeabilizzate per 45 minuti a 30 °C con saponina 1% in acqua bidistillata. La permeabilizzazione consente all'anticorpo policlonale anti-saporina di legarsi alla RIP endocitata, come pure agli anticorpi utilizzati per marcare le strutture subcellulari di legarsi ai loro bersagli. Le cellule vengono quindi lavate una volta con PBS e incubate per 1 ora a 30 °C con BSA 1% in PBS, per saturare i siti aspecifici di legame. Al termine dell'incubazione, le cellule vengono lavate due volte con PBS prima dell'incubazione con gli anticorpi primari.

### **MARCATURA DEL GOLGI E DEL RER E COLOCALIZZAZIONE DELLA SAPORINA**

Gli anticorpi primari vengono utilizzati per identificare la saporina, l'apparato del Golgi e il RER. La marcatura del Golgi e del RER viene effettuata per rilevare l'eventuale colocalizzazione della saporina con tali strutture cellulari.

Dopo il trattamento con la suddetta RIP (come descritto nel paragrafo precedente) le cellule HeLa vengono incubate, per 1 ora a 30 °C, in presenza dell' anticorpo di coniglio anti-saporina diluito 1:8000 in BSA 1%. Contemporaneamente le cellule vengono incubate con l'anticorpo monoclonale di topo anti-GM130 (diluito 1:1000) oppure con l'anticorpo monoclonale di topo anti-BiP (diluito 1:80), specifici rispettivamente per il Golgi e per il RER.

Si eseguono due lavaggi con PBS e i vetrini rotondi con le cellule vengono trasferiti in nuovi pozzetti, dove vengono aggiunti gli anticorpi secondari.

La rilevazione del primo anticorpo viene effettuata tramite anticorpo anti-*rabbit* coniugato con fluorescina (diluito 1:100). Gli anticorpi monoclonali anti-GM130 o anti-BIP vengono rilevati con un anticorpo anti-*mouse* coniugato con Cy5 (diluito 1:20). Le cellule vengono incubate in presenza degli anticorpi secondari per 1 ora, alla temperatura di 30 °C.

Al termine dell'incubazione, le cellule sono lavate per due volte con PBS e i vetrini rotondi vengono montati su un vetrino portaoggetto, utilizzando una soluzione di Mowiol 4-88 (10% w/v) in TRIS-HCl 0,1 M, pH 8,5, e glicerolo (20% w/v), contenente 1,4-diazabicyclo [2.2.2] ottano (2,5% w/v) per evitare l'indebolimento del segnale fluorescente.

Per rilevare la fluorescenza viene usato il microscopio confocale Radiance 2000, con obiettivo 40× a immersione. Le lunghezze d'onda usate per l'emissione della fluorescina e del Cy5 sono rispettivamente 488 e 637 nm. Per valutare la colocalizzazione dei fluorocromi viene usato il *software* LaserPix.

#### SAGGIO ENDONUCLEASI IV

L'endonucleasi IV, purificata da *E. Coli*, ha la capacità di individuare e riparare *gap* sul DNA dovuti al distacco di un'adenina.

Le cellule HeLa, seminate in piastre da 6 pozzi (100.000 cellule/pozzo) in terreno completo, dopo circa 18 ore dalla semina vengono trattate per 2 ore con saporina  $10^5$  M e incubate tutta la notte a 37 °C in assenza della RIP. Parallelamente viene preparato un campione di controllo non trattato con la saporina. Le cellule, finito il trattamento, sono state lavate due volte in PBS, staccate dal fondo della fiasca con lo *scraper*, contate e risospese in PBS alla concentrazione di  $10^5$  cellule/ml. A questo punto, 10 µl di ciascuna sospensione cellulare vengono rapidamente mescolati a 100 µl di LM agarose 1% (a 37 °C); da ogni miscela vengono subito prelevati 40 µl e posizionati al centro dell'apposito vetrino (fornito dalla ditta Trevigen). Appena la goccia contenente la sospensione cellulare appare asciutta, il vetrino viene immerso nella soluzione di lisi (contenente 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-base, 1% sodium lauryl sarcosinate, 1% Triton X-100) e incubato a 4 °C, per 2 ore al buio. Successivamente, il vetrino viene immerso per 30 minuti nel *buffer* preparato al momento (contenente 10 M HEPES-KOH, 0.1 M KCl, 10 M EDTA). A questo punto 40 µl di endonucleasi IV, diluita 1:75 con lo stesso tampone (fornito dalla Trevigen)

contente BSA, vengono posizionati sul vetrino che viene subito incubato per 1 ora a 37 °C. In seguito, i vetrini vengono immersi per 30 minuti all'interno del *buffer* di elettroforesi (0.5 M EDTA, 10 M NaOH, pH  $\geq 13$ ) e sottoposti a corsa elettroforetica (24 V e 150 mA) per 40 minuti a 4 °C. Finita la corsa, i vetrini vengono lavati due volte in acqua distillata e immersi in una soluzione di etanolo al 70% per 5 minuti. Il montaggio del vetrino è stato eseguito aggiungendo circa 10  $\mu$ l di DAPI/Anti-fade, che essendo un intercalante del DNA permette di visualizzare la cromatina. Le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza Eclipse E600 con un obiettivo 100X a immersione, utilizzando un filtro specifico per il DAPI ( $\lambda$  di eccitazione 358 nm,  $\lambda$  di emissione 461 nm).

### **3.2.5 ESPERIMENTI DI MICROSCOPIA ELETTRONICA**

La valutazione al microscopio elettronico del destino intracellulare della saporina è stata effettuata sia tramite un metodo diretto, che prevede l'uso del coniugato saporina-oro, sia tramite un metodo indiretto.

#### **DETERMINAZIONE DELLE CONDIZIONI OTTIMALI PER LA CONIUGAZIONE DELLA SAPORINA ALL'ORO**

In teoria qualsiasi proteina può essere assorbita sulla superficie delle particelle d'oro. Nel meccanismo di coniugazione sono coinvolte le forze di van der Waals, che si instaurano fra le cariche negative della superficie delle particelle d'oro ed i gruppi carichi positivamente delle proteine. E' stato dimostrato che l'assorbimento delle particelle all'oro dipende dal diametro delle proteine, dalla presenza di sali in soluzione, dal punto isoelettrico della proteina, per cui è necessario stabilire a priori il valore di pH al quale si effettuerà la procedura di coniugazione. Nella maggior parte dei casi l'assorbimento risulta massimo per valori di pH corrispondenti al punto isoelettrico della macromolecola proteica utilizzata o lievemente basici rispetto ad esso.

Prima di procedere alla coniugazione è necessaria una preparazione preliminare dei componenti del coniugato. Per eliminare ogni traccia di proteina precipitata, la saporina viene ultracentrifugata per 1 ora, a  $84.000\times g$ , a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e successivamente filtrata con filtro *millipore*  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ . L'oro, filtrato analogamente alla RIP, viene basificato con tampone carbonato-bicarbonato  $0,5\text{ M}$  pH 10.

Un punto chiave nella preparazione del coniugato è la determinazione della quantità ottimale di proteina necessaria per stabilizzare l'oro ed impedirne la flocculazione (cioè la precipitazione in aggregati). A questo scopo è stata utilizzata una serie di diluizioni scalari di proteina, secondo la metodica proposta da Horisbenger (1981), con alcune modificazioni.

Le prove di coniugazione vengono condotte in piastre da 96 pozzi. In ogni pozzo vengono aggiunti  $20\text{ }\mu\text{l}$  di diluizioni scalari di saporina (da 0 a  $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) e  $200\text{ }\mu\text{l}$  di oro colloidale pH 10. In seguito, la piastra è sottoposta a lieve agitazione alla temperatura di  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , per 10 minuti e infine vengono aggiunti  $10\text{ }\mu\text{l/pozzo}$  di NaCl 10%.

Se la proteina si presenta in quantità insufficiente per stabilizzare il colloide, la soluzione di oro floccula ed il suo colore vira dal rosso al blu. Come quantità ottimale di proteina si sceglie la concentrazione immediatamente superiore a quella che determina la flocculazione.

### **PREPARAZIONE DEL CONIUGATO ORO-SAPORINA**

La reazione di coniugazione viene condotta in tubi da ultracentrifuga Beckman, aggiungendo ad ogni tubo  $2,8\text{ ml}$  di saporina  $0,1\text{ mg/ml}$  e  $28\text{ ml}$  di oro pH 10. Per saturare l'oro che non ha reagito con la saporina, nei tubi, vengono aggiunti  $3\text{ ml}$  di PEG (poli-etilenglicole)  $8.000\text{ }10\%$  pH 10,7, segue un'agitazione manuale di 10 minuti. A questo punto, i tubi vengono ultracentrifugati per 2 ore, a  $49.000\times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Al termine della centrifugazione, all'interno del tubo sono presenti due *pellet*: il primo, sul fondo, appare rosso e molto lasso e costituisce il precipitato utile, il secondo (laterale) ha un colore rosso scuro e si presenta

molto stabile. Solo il precipitato utile viene risospeso in TRIS/PEG (tampone tris-HCl 0,02 M pH 7.5/PEG 8000 1%) e lavato nel medesimo tampone per quattro volte, mentre il sopranatante e il secondo *pellet* vengono eliminati. Il campione, raccolto in un tubo Beckman, è sottoposto ad un'ulteriore centrifugata nelle stesse condizioni descritte precedentemente, ma per 1 ora.

Poiché, dopo l'ultracentrifugata, sono ancora presenti due *pellet*, diventa necessario sottoporre il precipitato utile ad una terza centrifugata, senza modificare nessun parametro.

Alla fine dell'ultracentrifugata, il sopranatante viene eliminato e il *pellet* utile raccolto, diluito con saporina non coniugata in mezzo completo alla concentrazione finale di  $10^{-5}$  M ed utilizzato negli esperimenti successivi.

#### **INTOSSICAZIONE CELLULARE CON IL CONIUGATO SAPORINA-ORO (METODO DIRETTO)**

Le cellule HeLa vengono seminate in quattro piastre da sei pozzi (200.000 cellule/pozzo, in 1ml di mezzo completo) e dopo 48 ore dalla semina vengono intossicate con saporina  $10^{-5}$  M contenente il coniugato oro-saporina, come tracciante (circa 2%).

I campioni sono sottoposti a periodi di incubazioni continua in presenza della tossina legata all'oro, per intervalli di tempo variabili (40, 60, 120 minuti). Vengono inoltre preparati alcuni controlli di cellule non esposte alla tossina e altri di cellule trattate solo con oro non coniugato (diluito 1:1 con mezzo completo).

Allo scadere del tempo di incubazione, si eseguono tre lavaggi con 1 ml di PBS e successivamente le cellule vengono rimosse dal fondo del pozzetto con lo *scraper* aggiungendo 500  $\mu$ l di PBS.

L'esperimento è eseguito in doppio, ma alla fine i duplicati vengono riuniti (per avere un *pellet* cellulare più abbondante) e centrifugati a 4 °C, per 15 minuti, a 300×g.



I *pellet* asciugati delicatamente, senza essere rimossi dalla provetta della centrifuga, vengono fissati con 0.5 ml di *p*-formaldeide 4% in sodio fosfato 0.1 M pH 7.5, a 4 °C per almeno 24 ore.

#### **INTOSSICAZIONE CELLULARE CON SAPORINA NON CONIUGATA (METODO INDIRETTO)**

Le cellule (200.000 per pozzo) vengono trattate con saporina  $10^{-5}$  M in incubazione continua per 40, 60 e 120 minuti. Parallelamente vengono preparati campioni di controllo di cellule non esposte alla RIP. Le modalità sperimentali sono analoghe a quelle appena riportate per il metodo di rilevazione diretto. Il metodo indiretto si basa sulla rilevazione immunologica della saporina. Per questo motivo l'inclusione del *pellet* cellulare avviene in una resina acrilica, che anche in seguito alla polimerizzazione (indotta a 4 °C, da una lampada UV), preserva la struttura molecolare dei campioni inclusi e i loro siti antigenici. Prima dell'osservazione dei preparati al microscopio elettronico, le sezioni ultrasottili vengono raccolte all'interno di griglie, immerse per 15 minuti in PBS/BSA e successivamente incubate per 18 ore a 4 °C con anticorpo policlonale di coniglio anti-saporina diluito da 1:4000 a 1:8000 in PBS/BSA. Le griglie vengono lavate in PBS e incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con anticorpo secondario anti-coniglio marcato con oro colloidale del diametro di 5 nm, diluito 1:10, o di 10 nm, diluito 1:5, in PBS/BSA.

#### **PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA MICROSCOPIA ELETTRONICA**

Poiché la luce del microscopio ottico ed il fascio di elettroni del microscopio elettronico possono attraversare solo materiale di spessore molto ridotto, le cellule vengono trattate in modo da poter essere sezionate mediante speciali apparecchi, detti ultramicrotomi.

Fissazione, disidratazione, inclusione, taglio e contrasto sono le fasi di preparazione del campione cellulare per l'osservazione al microscopio elettronico.

I *pellet* cellulari vengono dapprima lavati con 0,5 ml di tampone fosfato 0.15 M pH 7.4 e successivamente passati in tetrossido di osmio al 2% in H<sub>2</sub>O per 20 minuti. Il tetrossido di osmio fissa i lipidi insaturi e, reagendo in maniera differente con i vari componenti cellulari, accentua le differenze di densità.

Prima di passare alla fase di disidratazione, si esegue un lavaggio di 10 minuti in tampone fosfato 0.15 M pH 7.4 e si preparano soluzioni di etanolo, in concentrazioni scalari (70%, 90% e 100%). Per disidratare le cellule vengono eseguiti tre lavaggi di 5 minuti per ogni diluizione di etanolo preparata, partendo dalla soluzione a concentrazione più bassa. Al termine dell'ultimo lavaggio, le cellule vengono messe in ossido di propilene 100% per 20 minuti. L'ossido di propilene si sostituisce all'etanolo, all'interno delle cellule, ed evaporando molto velocemente (infatti bolle a 34-35 °C) non lascia tracce e permette di effettuare il passaggio delle cellule in resina.

A questo punto si esegue la fase di inclusione, che permette di impregnare il campione in un materiale abbastanza duro, per preservare le strutture cellulari durante il taglio, e omogeneo, requisito fondamentale affinché il campione possa essere tagliato in fette molto sottili. La fase di inclusione avviene in resine diverse a seconda del metodo di rilevazione usato.

Per il metodo diretto viene usata la resina epossidica araldite che è preparata diluendola con un ugual volume dell'anidride DDSA EM (dodeciny succinic anhydride) e aggiungendo l'ammina aromatica tris (dimetilaminometil) fenolo all'1,5% del volume totale, per catalizzare la reazione di polimerizzazione. La resina, così preparata, sarà chiamata in seguito resina pura.

La resina, all'interno delle cellule, occupa lo spazio lasciato libero dall'ossido di propilene, per cui quest'ultimo deve essere eliminato. A

questo scopo vengono preparate tre soluzioni formate da resina (in quantità gradualmente crescente) e da ossido di propilene, nel modo seguente:

Soluzione	% ossido di propilene	% resina
<b>1</b>	<b>75%</b>	<b>25%</b>
<b>2</b>	<b>50%</b>	<b>50%</b>
<b>3</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>

Il tempo di impregnazione dei campioni, con le prime due soluzioni, è di un'ora, mentre per la terza soluzione sono previste circa 12 ore. Allo scadere del tempo, l'ultima soluzione viene sostituita con resina pura e i campioni cellulari vengono messi a 60 °C, poiché l'elevata temperatura permette la polimerizzazione della resina.

Gli esperimenti di immunoelettromicroscopia, com'è stato precedentemente detto, prevedono l'uso di una resina acrilica, poiché quest'ultima al contrario delle resine epossidiche, non forma legami forti con la struttura molecolare. Inoltre le resine acriliche permettono di ottenere inclusioni a bassa viscosità e a basse temperature per preservare la struttura molecolare dei campioni inclusi ed i loro siti antigenici.

Successivamente si attua il taglio dei campioni. Solitamente, per verificare lo stato dei preparati e per individuare un'area abbastanza ricca di cellule, vengono tagliate delle sezioni semifini (1 µm di spessore) e osservate al microscopio ottico. Solo quando si riescono a individuare dei campi utili per l'esame ultrastrutturale, vengono preparate le sezioni ultrafini (60-70 nm di spessore) sostituendo nell'ultramicrotomo la lama di vetro con una di diamante.

Le sezioni vengono contrastate immergendole in citrato di piombo per 10 minuti e poi in acetato di uranile per altri 10 minuti. A questo punto i campioni sono pronti per essere osservati al microscopio elettronico.

### 3.2.6 ESPERIMENTI BASATI SUL SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE

Per valutare la perdita di vitalità cellulare indotta in cellule HeLa dalle RIP bicateinarie lanceolina, stenodactilina e volkensina, è stato utilizzato il *CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega). Questo kit colorimetrico permette di avere una misurazione indiretta del numero di cellule vitali. Il composto tetrazolico MTS, di colore giallo, viene metabolizzato dalle cellule vive originando il formazano, un prodotto solubile in RPMI, di colorazione rossa. Questa reazione è catalizzata dal NADPH o dal NADH, prodotti delle deidrogenasi, che sono attive solo nelle cellule in grado di metabolizzare. La quantità di formazano prodotto, rilevata a 490 nm, è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali. Le cellule ( $4 \times 10^3$ /pozzo) sono seminate in 100  $\mu$ l di mezzo completo, in piastre da 96 pozzetti. Dopo 18 ore, le cellule vengono trattate con 100  $\mu$ l di lanceolina, stenodactilina o volkensina alla diluizione appropriata (da  $10^{-15}$  a  $10^{-9}$  M). Dopo 24 ore di incubazione sono aggiunti 20  $\mu$ l di *CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent* e dopo un'ulteriore ora di incubazione sono state effettuate le letture a 490 nm.

Questo tipo di saggio viene anche usato per valutare:

1. l'efficienza di legame;
2. l'effetto dell'inibizione del complesso proteasomale sulla capacità di lanceolina, stenodactilina e volkensina di inibire la vitalità cellulare;
3. la resistenza delle RIP alla degradazione proteasica;

Nel primo caso, le cellule dopo 18 ore dalla semina, vengono trattate con le RIP per tempi brevi (da 10 a 60 minuti) a 0 °C. In parallelo, alcuni pozzi sono stati pre-incubati con galattosio 50 mM, a 37°C per 1 ora e successivamente trattate per 60 minuti con le RIP a 0 °C. In tutti i casi, dopo il trattamento a freddo, le cellule sono state incubate in assenza di RIP per 24 ore a 37 °C, prima di effettuare il saggio di valutazione della vitalità cellulare.

Nel secondo caso, dopo 18 ore dalla semina, le cellule sono state pre-incubate per 1 ora con 10  $\mu$ M di *Proteasome inhibitor II* (Calbiochem). Successivamente, le cellule sono state lavate e trattate con lanceolina, stenodactilina o volkensina ( $10^{-13}$  M). Dopo 24 ore, è stato eseguito il saggio di vitalità cellulare.

Nel terzo caso, le RIP e le proteasi sono state miscelate a concentrazione equimolare ( $10^{-5}$  M) in PBS e incubate per 1 ora a 37 °C. Successivamente, le RIP trattate sono state usate in un saggio di vitalità a 24 ore, per confrontare l'efficienza citotossica delle RIP trattate con proteasi con quella delle RIP allo stato nativo. Le concentrazioni proteiche usate per eseguire il saggio di vitalità sono state  $10^{-12}$  M per lanceolina e volkensina e  $10^{-13}$  M per la stenodactilina.

### 3.2.7 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI MEDIANTE MISURAZIONE DELLE CASPASI 3/7

Il *Caspase-GloTM 3/7 Assay* (Promega) è un saggio luminescente che misura l'attività delle caspasi 3 e 7. Queste ultime sono delle proteasi effettrici specifiche, che giocano un ruolo importante nell'apoptosi delle cellule di mammifero. L'attivazione delle caspasi è indice diretto della morte cellulare programmata. Il *kit Caspase-GloTM 3/7* contiene un substrato che presenta una sequenza tetrapeptidica DEVD, che reagisce con le caspasi 3 e 7 attivate, generando un segnale luminescente prodotto dalla luciferasi. La luminescenza è proporzionale alla quantità di caspasi 3 e 7 attivate presenti.

Cellule HeLa ( $4 \times 10^3$ /pozzo in 100  $\mu$ l di mezzo completo) vengono seminate a scacchiera in una piastra da 96 pozzetti. Questo tipo di disposizione evita che ci sia interferenza tra la luce prodotta in pozzetti adiacenti. Le cellule sono trattate con lanceolina o stenodactilina  $10^{-13}$  M a 37 °C, per vari tempi di incubazione (vedi sezione Risultati). In seguito, ad ogni pozzo vengono aggiunti 50  $\mu$ l di PBS e 50  $\mu$ l di *Caspase-GloTM 3/7 Assay* e le piastre sono incubate a temperatura ambiente per 1 ora. Per ottenere la lisi, le cellule

vengono agitate direttamente dallo strumento di lettura per 1 minuto mediante rotazioni da 1 mm a 420 rpm. Dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la lettura delle piastre è stata effettuata mediante luminometro Fluoroskan Ascent FL (tempo di integrazione 10 s).

### 3.2.8 DETERMINAZIONE DI *BINDING*, *UPTAKE* ED ESOCITOSI CELLULARE DI LANCEOLINA E STENODACTILINA

Cellule HeLa sono seminate in piastre da 24 pozzi ( $10^5$ /pozzo) in terreno completo e dopo circa 18 ore dalla semina sono stati eseguiti gli esperimenti per determinare il *binding*, l'*uptake* e l'esocitosi cellulare di lanceolina e stenodactilina, come descritto da Battelli *et al.*, 2004.

Per determinare il *binding*, le cellule sono state incubate a 0°C per 1 ora con concentrazioni scalari ( $3 \times 10^{-9}$ - $10^{-7}$  M,  $10^6$  cpm/pozzo) di lanceolina e stenodactilina marcate con  $^{125}$ I. Successivamente, le cellule sono state lavate 5 volte con PBS freddo, pH 7.5 e disciolte in KOH 0.1 N per 10 minuti, a 37 °C. Culture cellulari parallele sono state incubate nelle stesse condizioni, ma in presenza di lattosio 0.1 M, per determinare il legame aspecifico delle RIP alla membrana. La radioattività associata alle cellule è stata determinata tramite lettura al  $\gamma$ -counter. Per determinare il numero di siti di legame di ciascuna RIP per cellula e la costante di dissociazione recettore-ligando ( $K_d$ ) è stata usata l'analisi Scatchard (Holleman e Bertina, 1975).

Per misurare l'*uptake* cellulare di lanceolina e stenodactilina, le cellule sono state incubate con  $^{125}$ I-RIP ( $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^6$  cpm/pozzo), per intervalli di tempo crescenti (da 0 a 120 minuti) a 37 °C in mezzo completo contenente Hepes. Dopo una serie di lavaggi con PBS freddo, le RIP associate alla membrana sono state estratte tramite incubazione con *buffer* glicina/HCl 0.1 M, pH 2, contenente NaCl 0.04 M, per 30 minuti a 0 °C. Successivamente, le cellule sono state disciolte in KOH 0.1 M per 10 minuti a 37 °C, per misurare la quantità intracellulare di RIP.

Per valutare la quantità di lanceolina e stenodactilina esocitata dalle cellule e la loro degradazione, le cellule sono state trattate con  $^{125}\text{I}$ -RIP ( $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^6$  cpm/pozzo) per 1 ora a 0 °C, per consentire il legame delle RIP alla membrana. Dopo tre lavaggi con mezzo di coltura freddo, le cellule sono state incubate a 37 °C per ulteriori 2 ore. L'internalizzazione di lanceolina e stenodactilina è stata bloccata ponendo le piastre di coltura in ghiaccio e il surnatante cellulare è stato separato dal monostrato, per essere analizzato.

A questo punto un'aliquota del surnatante cellulare (100 µl) viene acidificata con TCA 10% e centrifugata a  $4000 \times g$  per 20 minuti. Questo passaggio permette di scindere la frazione acido solubile, contenente le proteine degradate, dal *pellet* in cui si trova la componente proteica ancora integra e di misurarne tramite lettura al  $\gamma$ -counter il rispettivo valore di radioattività. Il resto del sopranatante cellulare è stato usato per verificare l'attività residua delle RIP esocitate, tramite un saggio di inibizione della sintesi proteica cellulare. La concentrazione proteica ancora attiva viene calcolata per estrapolazione da una curva standard di inibizione della sintesi proteica, ottenuta usando concentrazioni scalari note di lanceolina e stenodactilina.

## **Capitolo 4**

# **Risultati e Discussioni**

### **STUDI SULLA SAPORINA**

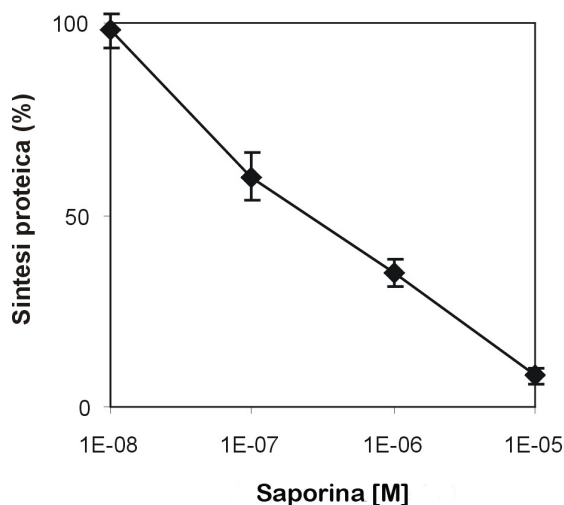


## CITOTOSSICITÀ E *ROUTING* INTRACELLULARE DELLA SAPORINA

Come descritto nell'Introduzione, tra le possibili applicazioni delle RIP c'è la costruzione di immunoconiugati come farmaci antitumorali e/o immunosoppressivi. A tale scopo sono particolarmente utilizzate le RIP a singola catena, tra cui in particolare che la saporina (Bolognesi *et al.*, 2005), estratta dai semi di *Saponaria officinalis*. L'eventuale utilizzo terapeutico richiede la conoscenza preliminare dell'interazione con le cellule umane e dei meccanismi di tossicità. Nonostante ciò, ben poche sono le informazioni in letteratura riguardanti il traffico di questa RIP monocatenaria. Per tale motivo una parte del lavoro di questa tesi è stato incentrato sullo studio del *routing* intracellulare della saporina.

### 4.1 INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA CELLULARE

Esperimenti preliminari sono stati condotti per valutare la citotossicità della saporina sul modello cellulare usato, determinando la capacità di inibire la sintesi proteica in vitro.



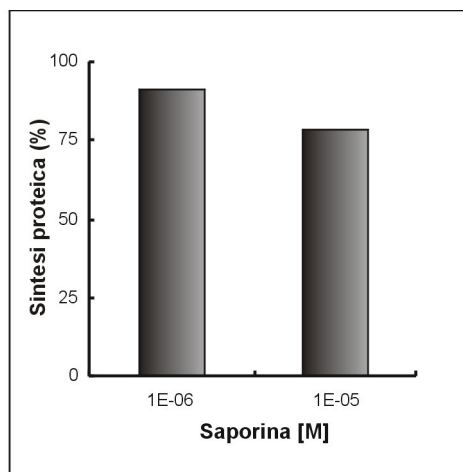
**Figura 7. Inibizione della sintesi proteica nelle cellule trattate con saporina per 24 ore.**

Le cellule HeLa sono state incubate per 24 ore continuamente in presenza della RIP alle concentrazioni indicate e successivamente è stata determinata la quantità di  $^3\text{H}$ -leucina incorporata dalle cellule. In ordinata è riportata la sintesi proteica espressa come percentuale rispetto ai controlli. I valori sono stati ottenuti dalla media di tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard. Il valore di  $\text{IC}_{50}$  è stato calcolato per interpolazione sulla retta di regressione.

La saporina, come mostra la curva dose-risposta sopra riportata, già alla concentrazione di  $10^{-6}$  M è in grado di inibire del 60% la sintesi proteica, mentre

alla concentrazione di  $10^{-5}$  M la inibisce di circa il 90%. L' $IC_{50}$  (concentrazione di RIP che inibisce del 50% la sintesi proteica), calcolata sulla base dei valori di radioattività incorporata dalle proteine, è risultata di  $6.1 \times 10^{-7}$  M. Questo dato è sicuramente tra i più bassi tra quelli ottenuti per le RIP monocatenarie su cellule HeLa. Infatti, se confrontato con quello di gelonina, momordina e PAP-S, risulta più basso di un ordine di grandezza, indicando la saporina come una delle RIP monocatenarie più attive in questa linea cellulare (dalla rassegna Barbieri *et al.*, 1993).

Un ulteriore saggio di inibizione della sintesi proteica è stato eseguito per valutare il livello di tossicità della saporina nel corso dei successivi esperimenti, che prevedono un tempo massimo di esposizione di 2 ore. A questo scopo, cellule HeLa sono state esposte alla RIP per 2 ore e successivamente sono state incubate in assenza della saporina per ulteriori 18 ore (metodo *pulse and chase*) (figura 8).



**Figura 8. Inibizione della sintesi proteica in cellule trattate con saporina per 2 ore.**

Cellule HeLa sono state incubate per 2 ore in presenza di saporina  $1 \times 10^{-6}$  oppure  $1 \times 10^{-5}$  M. Successivamente, i pozzi sono stati lavati e le cellule sono state incubate per 18 ore a  $37^\circ\text{C}$ , prima di procedere al saggio di determinazione di incorporazione della leucina radioattiva. La sintesi proteica è espressa come percentuale rispetto ai controlli.

Come si evince dalla figura 8, le cellule sottoposte al *pulse* presentano un'inibizione della sintesi proteica piuttosto scarsa rispetto ai controlli incubati senza la saporina. Infatti, l'inibizione della sintesi proteica è limitata al 22% per la concentrazione superiore ed è praticamente assente (8%) alla concentrazione inferiore di saporina. Questo permette di eseguire i successivi esperimenti di localizzazione della saporina, che prevedono incubazioni con la RIP alla concentrazione di  $10^{-5}$  M per tempi brevi, escludendo che i risultati possano essere inficiati da precoci effetti tossici.

#### 4.2 VALUTAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE INTRACELLULARE DELLA SAPORINA MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA

Per rilevare la distribuzione intracellulare della saporina e la sua eventuale colocalizzazione con l'apparato del Golgi e con il reticolo endoplasmatico rugoso (RER), è stata utilizzata l'immunofluorescenza indiretta abbinata alla microscopia confocale. Il metodo indiretto permette di analizzare il traffico intracellulare della RIP, senza l'interferenza che potrebbe essere introdotta da una marcatura diretta della molecola in esame. La microscopia confocale elabora il segnale fluorescente considerando la cellula nel suo spessore, consentendo così di calcolare la distribuzione percentuale e di valutare la colocalizzazione di due segnali.

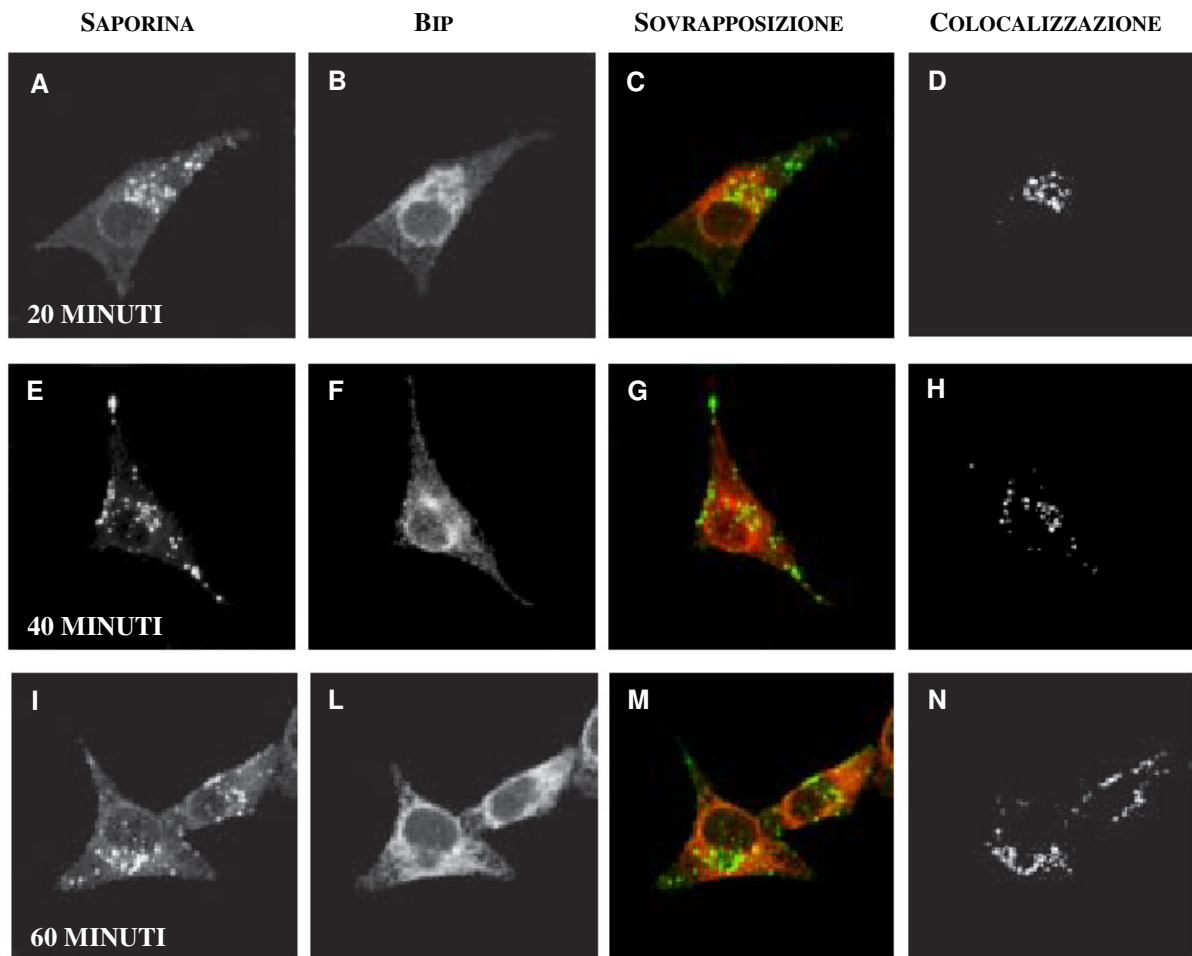
Questi esperimenti sono stati eseguiti con la metodica del *pulse and chase*, con lo scopo di ridurre l'interferenza del segnale fluorescente originato da nuove molecole della sostanza in esame che continuano ad entrare nella cellula.

La saporina viene marcata con fluorescina, mentre il Golgi o il RER vengono resi visibili dalla marcatura con Cy5 della proteina GM130 (proteina associata al *cis*-Golgi e coinvolta nel trasporto delle vescicole dal RER al Golgi) o della proteina BIP, una chaperonina del reticolo endoplasmatico.

Le immagini (figura 9) mostrano che, dopo 20 minuti, la RIP è presente in vescicole sparse nel citoplasma e dopo 40 e 60 minuti di incubazione totale, si localizza in vescicole in prossimità del nucleo.

In tutti i casi, la localizzazione è sovrapposta a quella del marcatore del RER (figura 9).

**COLOCALIZZAZIONE DELLA SAPORINA CON IL RER**

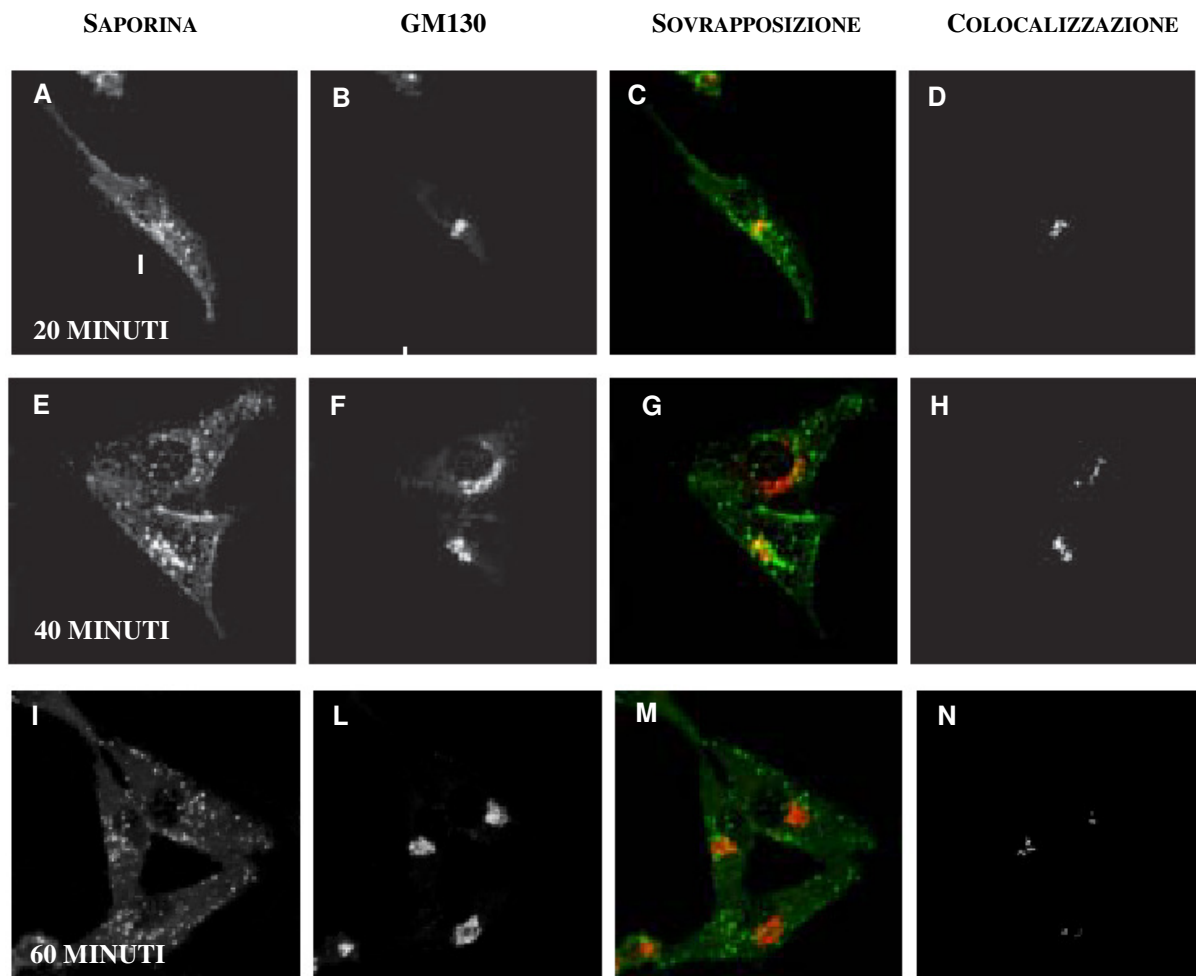


**Figura 9. Analisi di immunofluorescenza per la saporina (A, E, I) e per la proteina BIP (B, F, L) in cellule HeLa.**

Le cellule sono state incubate con saporina  $10^{-5}$  M per 20 minuti a 37 °C, lavate e incubate a 37 °C per successivi 0 (A-D), 20 (E-H) e 40 (I-N) minuti. I minuti indicati nei pannelli (A, E, I) corrispondono al tempo totale di esposizione alla RIP. Nei pannelli G, C, M si osserva la sovrapposizione della saporina (verde) con il RER (rosso). Nei pannelli D, H ed N vengono visualizzate solo le aree in cui vi è colocalizzazione dei due segnali fluorescenti.

Le analisi di immunofluorescenza con l'anticorpo anti-saporina e anti-GM130 mostrano una parziale colocalizzazione tra la RIP e il Golgi (figura 10). Il segnale di sovrapposizione tra la saporina e il Golgi sembra subire un incremento quando si passa da 20 a 40 minuti di incubazione (pannelli D e H).

**COLOCALIZZAZIONE DELLA SAPORINA CON L'APPARATO DEL GOLGI**

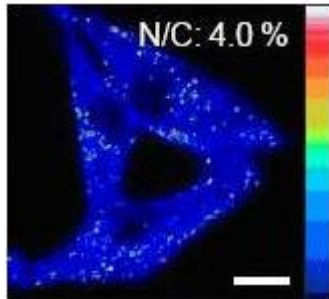


**Figura 10. Analisi di immunofluorescenza per la saporina (A, E, I) e per la proteina GM130 (B, F, L) in cellule HeLa.**

Le cellule sono state incubate con saporina  $10^{-5}$  M per 20 minuti a 37 °C, lavate e incubate a 37 °C per successivi 0 (A-D), 20 (E-H) e 40 (I-N) minuti. I minuti indicati nei pannelli (A, E, I) corrispondono al tempo totale di esposizione alla RIP. Nei pannelli C, G, M si osserva la sovrapposizione della saporina (verde) con il Golgi (rosso). Nei pannelli D, H ed N vengono visualizzate solo le aree in cui vi è colocalizzazione dei due segnali fluorescenti.

La scarsa colocalizzazione della saporina con il Golgi, conferma le osservazioni di Vago e collaboratori (Vago *et al.*, 2005) che suggeriscono per questa RIP un *routing* alternativo rispetto a quello della ricina e delle RIP di tipo 2, che necessariamente passano per il TGN (van Deurs *et al.*, 1986) per raggiungere il target ribosomiale.

L'osservazione al microscopio confocale delle cellule trattate ha rilevato la presenza della saporina anche nel nucleo, seppur in piccole quantità (figura 11).



**Figura 11. Analisi di immunofluorescenza per la saporina in cellule HeLa.**

Le cellule sono trattate con saporina  $10^{-5}$  M per 20 minuti a 37 °C, lavate e incubate a 37 °C per ulteriori 40 minuti. Nella foto affianco si osserva la presenza della saporina nel citoplasma e, seppur in piccola quantità, all'interno del nucleo. La quantità di saporina all'interno del nucleo è stata calcolata come rapporto tra la RIP nucleare e citoplasmatica (N/C) ed è stata espressa in percentuale. Barra, 10  $\mu$ m.

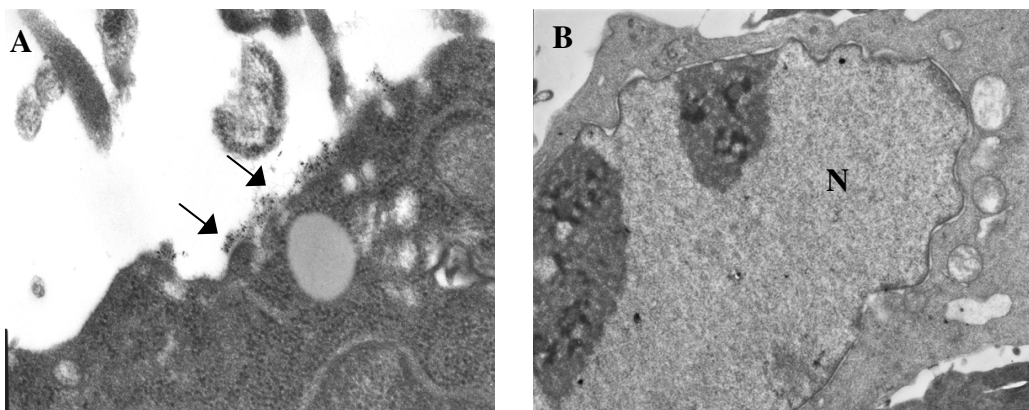
Questo dato, nuovo ed interessante, non può essere subito confermato a causa della bassa quantità di segnale rilevato e per i limiti della tecnica usata. Per questo motivo, come verrà successivamente chiarito, è stata utilizzata la microscopia elettronica per rilevare le tappe del *routing* della saporina ed eventualmente confermare la presenza della RIP nel nucleo.

#### 4.3 Traffico intracellulare della saporina valutato mediante microscopia elettronica - metodo diretto

Per valutare ulteriormente il routing intracellulare della saporina è stata usata la microscopia elettronica, con lo scopo di ottenere immagini più chiare delle varie tappe intracellulari della RIP.

Per studiare la cinetica del traffico intracellulare della tossina, le cellule vengono esposte continuamente e per tempi crescenti al coniugato saporina-oro colloidale. Il basso livello di *uptake* consente di utilizzare un'esposizione continua senza ricorrere al *pulse*.

##### EFFETTO DELL'ORO NON CONIUGATO SULLE CELLULE HELA DI CONTROLLO



**Figura 12. Cellule di controllo.**

Cellule trattate con oro non coniugato (A), l'oro rimane fuori dalla cellula (freccie nere) a ridosso della membrana citoplasmatica. (B) Cellule fissate, senza subire nessun trattamento: le cellule mostrano una buona conservazione nucleo-citoplasmatica, che dimostra l'adeguatezza del metodo di fissazione (N=nucleo).

L'oro non coniugato, nelle cellule di controllo, viene visualizzato a ridosso della membrana plasmatica, secondo una distribuzione lineare (figura 12A). La presenza del metallo non ha nessun effetto sulle cellule, che appaiono integre, analogamente alle cellule di controllo, fissate senza subire nessun tipo di trattamento (figura 12B). questo risultato esclude che l'oro non coniugato alla saporina venga endocitato, autorizzando a considerare la visualizzazione dell'oro all'interno della cellula equivalente alla presenza di saporina.

#### 4.3.1 ENDOCITOSI E SUCCESSIVE FASI DEL ROUTING

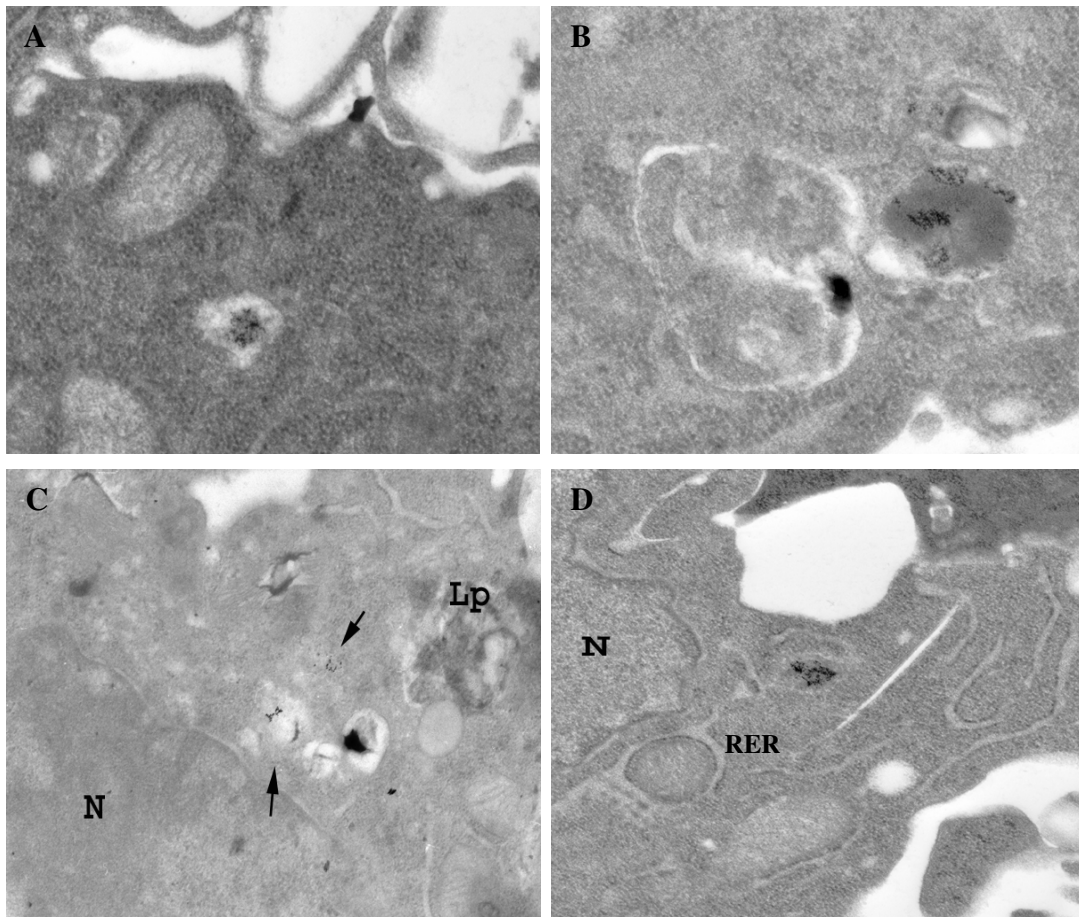
L'ingresso della saporina all'interno della cellula non sembra coinvolgere nessun recettore di membrana ad alta affinità, poiché la quantità di tossina internalizzata è bassa, inoltre solo molto raramente vengono osservate vescicole rivestite contenenti saporina (figura 13).



**Figura 13. Endocitosi della saporina.** Cellule incubate per 20 minuti con il coniugato oro-saporina. La RIP si presenta in agglomerati (freccia nera) in prossimità della membrana plasmatica, e viene visualizzata all'interno di endosomi precoci (freccia bianca) e, occasionalmente, anche in vescicole rivestite (freccia grigia).

Il coniugato oro-saporina si presenta in agglomerati a ridosso della membrana plasmatica e viene internalizzato in endosomi precoci (figura 13) già dopo 20 minuti di incubazione. Questo tipo di distribuzione in agglomerati della RIP sulla superficie della cellula non contrasta con la presenza di recettori a bassa affinità (come esposto nell'Introduzione).

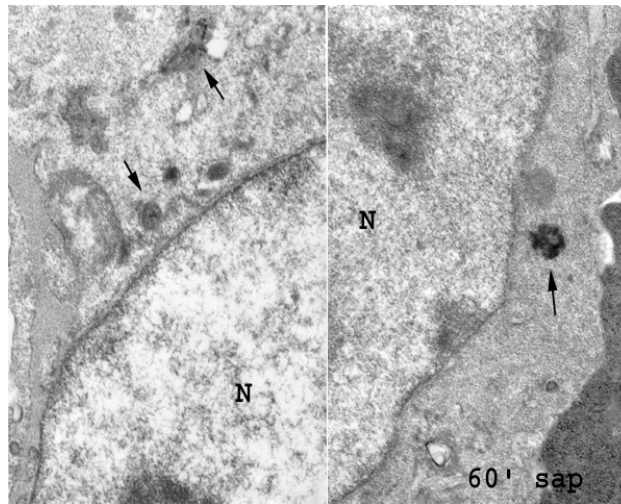




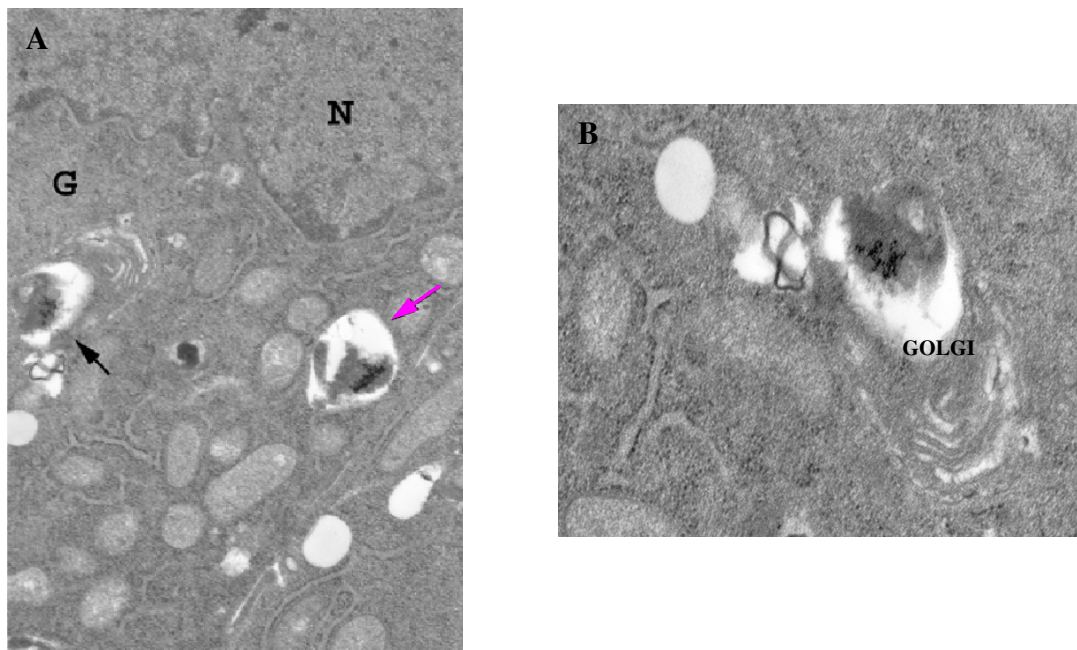
**Figura 14. Maturazione degli endosomi contenenti la saporina.**

Cellule incubate per 40 minuti in presenza del coniugato oro-saporina. La saporina è rinvenibile all'interno di endosomi precoci (A) e tardivi (B). In (C), sono visibili delle vescicole perinucleari, in (D) si osservano agglomerati di particelle in vicinanza del RER. (N=nucleo; Lp=lisosomi; RER=reticolo endoplasmatico rugoso).

Dopo 40 minuti di incubazione, la saporina è visualizzabile non solo negli endosomi precoci (figura 14A), ma anche in endosomi più maturi (figura 14B). La tossina prosegue il suo percorso di internalizzazione e si localizza in strutture perinucleari. Infatti, si osservano vescicole in prossimità del nucleo e delle cisterne perinucleari del RER (figura 14C, D). Incubando le cellule con la RIP per tempi più prolungati, è stato osservato che dopo 60 minuti la saporina si trova all'interno di strutture lisosomiali in prossimità del nucleo (Figura 15).



**Figura 15. Presenza della saporina nei lisosomi.**  
Cellule incubate per 60 minuti con il coniugato oro-saporina. Agglomerati di oro coniugato sono contenuti all'interno di strutture lisosomiali in prossimità del nucleo (freccie nere).

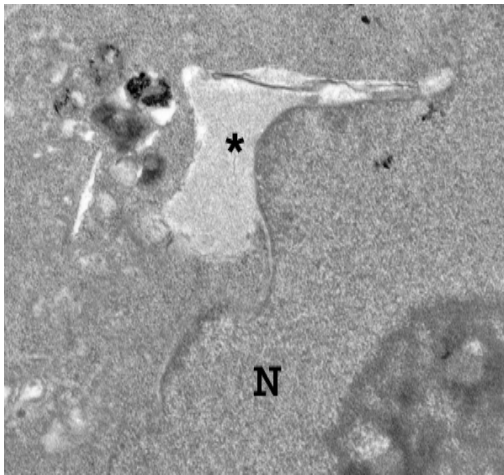


**Figura 16. Localizzazione perinucleare della saporina.**  
Cellule incubate per 120 minuti con il coniugato oro-saporina. L'apparato del Golgi ha una struttura ben mantenuta (A) e (B) e all'apice delle sue cisterne si osserva la presenza di particelle di saporina (A, freccia nera). Vescicole contenenti RIP sono rilevabile in prossimità del nucleo (A, freccia fucsia).

Nelle cellule incubate in presenza della RIP per 2 ore, si osserva che la saporina è prevalentemente localizzata in sede perinucleare all'interno di vescicole lisosomiali. In alcuni casi i lisosomi, con all'interno il coniugato, sembrano

fondersi con le vescicole del *trans*-Golgi network (TNG) (figura 16A, B). L'apparato del Golgi non mostra alcuna alterazione.

In alcuni casi, nei campioni trattati per 120 minuti, si osservano delle alterazioni morfologiche, ovvero delle dilatazioni a livello di alcune cisterne perinucleari del RER (figura 17).



**Figura 17. Alterazioni morfologiche delle cellule intossicate.**

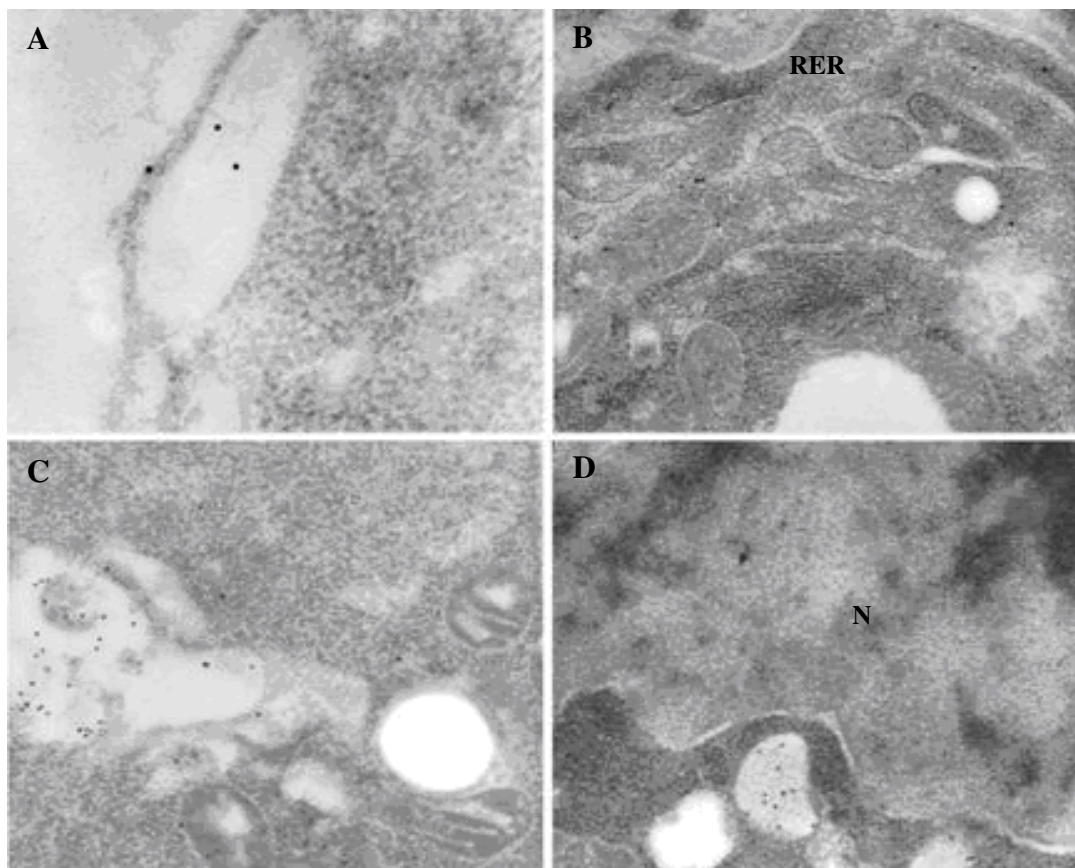
Cellule incubate per 120 minuti con il coniugato oro-saporina. Si osservano dilatazioni di cisterne perinucleari del ER (\*).

Dilatazioni delle cisterne del ER di questo tipo non vengono mai osservate nei controlli e perciò non possono essere considerate un artefatto della procedura sperimentale, ma è ragionevole pensare che rappresentino un effetto della RIP. Il danno alle cisterne nella zona perinucleare potrebbe essere tuttavia accentuato dalle tecniche di processamento del campione per la microscopia elettronica, poiché la resina usata (vedi Materiali e Metodi) essendo epossidica è molto dura. In nessuno dei campioni esaminati è stata riscontrata la presenza del coniugato oro-saporina all'interno del nucleo. Questo dato potrebbe essere dovuto alla procedura sperimentale, che come spiegato ha previsto la coniugazione diretta della saporina all'oro colloidale.

#### 4.4 TRAFFICO INTRACELLULARE DELLA SAPORINA VALUTATO MEDIANTE MICROSCOPIA ELETTRONICA – METODO INDIRETTO

Per verificare se il *routing* osservato in microscopia elettronica era anche solo parzialmente influenzato dalla coniugazione della saporina all'oro colloidale, onde confermare i risultati fin qui ottenuti, è stato eseguito un saggio di microscopia elettronica usando il metodo indiretto. Infatti, studi condotti con la ricina hanno dimostrato che la coniugazione può modificare la distribuzione intracellulare delle RIP, anche in dipendenza del *carrier* utilizzato (van Deurs *et al.*, 1986). Questa procedura prevede l'utilizzo di un anticorpo anti-saporina rilevato tramite un anticorpo secondario marcato con oro colloidale.

##### 4.4.1 ENDOCITOSI E FASI DEL ROUTING



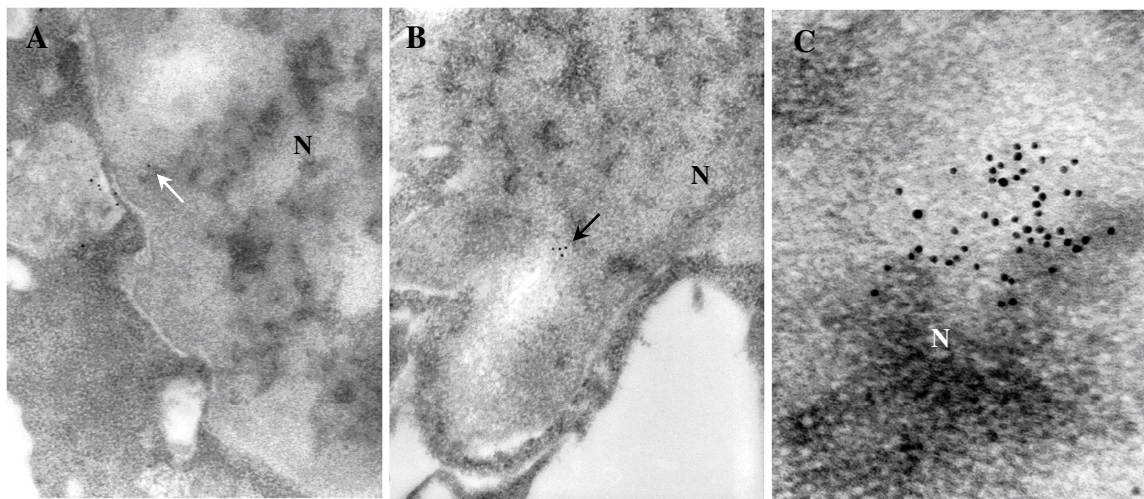
**Figura 18:** Localizzazione intracellulare della saporina tramite saggio di immunoelettromicroscopia.

Cellule incubate per tempi crescenti in presenza della RIP. Dopo 20 minuti di incubazione (A) la saporina è localizzata in vacuoli al di sopra del plasmalemma. Dopo 40 (C) e 60 (D) minuti di incubazione i vacuoli contenenti particelle di oro raggiungono progressivamente la zona perinucleare. Particelle d'oro sono state anche osservate libere nel citoplasma (B).



Anche in questo caso, le cellule sono state esposte continuativamente alla saporina, per tempi crescenti. Le immagini (figura 18) mostrano una prima fase del *routing* intracellulare della saporina simile a quanto osservato coniugando direttamente la RIP alle particelle d'oro. Infatti dopo 20 minuti, la saporina viene internalizzata dalla cellula e già dopo 40 minuti, si trova in vacuoli all'interno del citoplasma che raggiungeranno progressivamente la zona della membrana nucleare. Inoltre, sono state osservate particelle d'oro libere all'interno del citosol, che non erano emerse tramite l'utilizzo della tecnica diretta (figura 18B) e occasionalmente, dopo 60 minuti di incubazione, sono state osservate particelle d'oro all'interno di strutture ibride formati dalla fusione di vacuoli con cisterne del RER (dato non riportato).

Contrariamente a quanto osservato col metodo diretto, l'immunolettromicroscopia ha evidenziato la presenza di saporina all'interno del nucleo, come mostra la figura 19. Questo dato è stato osservato in circa il 10% delle cellule analizzate. Tuttavia, solo nel 2% dei casi è stato rilevato un ricco gruppo di particelle d'oro, mentre nell'8% dei casi è stata rilevata la presenza di circa 10 molecole d'oro per ciascun nucleo.

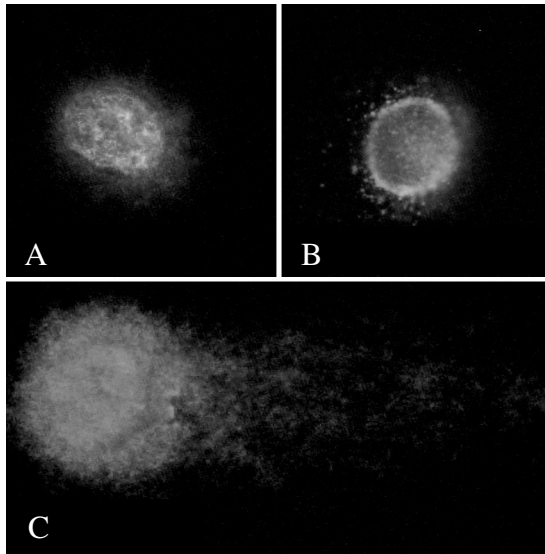


**Figura 19: Localizzazione nucleare della saporina.**

Dopo 40 minuti di incubazione, la saporina è già localizzata in vacuoli in prossimità del nucleo (A) ed è possibile notare la presenza di qualche particella d'oro all'interno della matrice nucleare (freccia bianca). Dopo 60 minuti di incubazione (B, C) la saporina si trova all'interno del nucleo (B) e in qualche caso è presente un corposo gruppo di molecole d'oro (C).

I dati ottenuti con l'immuno-elettromicroscopia, confermano quanto precedentemente osservato con gli esperimenti di immunofluorescenza.

Per indagare ulteriormente sulla possibilità che la saporina, seppur in piccole quantità, possa raggiungere il nucleo ed esercitare la propria attività sul DNA, è stato messo a punto uno specifico saggio comet.



**Figura 20. Saggio comet per valutare l'attività enzimatica della saporina sul DNA in cellule HeLa.**

Le cellule sono trattate con saporina  $10^{-5}$  M per 16 ore a 37 °C, lavate e incubate con l'endonucleasi IV. Lo stato del materiale genetico delle cellule è valutato al microscopio a fluorescenza dopo corsa elettroforetica. Stato della cromatina in cellule di controllo (A), in cellule trattate con saporina (C) e in cellule trattate con la RIP e successivamente con l'endonucleasi IV (B).

Il metodo usato si avvale dell'endonucleasi IV, purificata da *E.Coli*, che è in grado di individuare e riparare *gap* sul DNA dovuti al distacco di un'adenina, consentendo di individuare i nuclei che presentano questo tipo di danni.

La cromatina delle cellule di controllo (figura 20A) risulta integra, segno che la procedura sperimentale non ha alterato lo stato dei nuclei. La corsa elettroforetica nei nuclei delle cellule trattate con saporina (figura 20C) ha evidenziato la formazione di una coda, nel 90% dei casi, indice di frammentazione del DNA. Questi danni vengono riparati dalla endonucleasi IV. Infatti, si assiste ad un ricompattamento della cromatina (figura 20B) nei nuclei trattati con tale enzima, dimostrando che il danno era dovuto alla depurinazione.

La presenza della saporina nel nucleo, rilevata con l'immuno-elettromicroscopia, e i risultati ottenuti con il saggio comet aprono le porte a molte nuove domande circa i meccanismi citotossici usati dalla RIP per indurre la morte cellulare.

Infatti, i nostri risultati indicano che la saporina, seppure in maniera marginale, è in grado di accedere al nucleo delle cellule HeLa e questa è la prima volta che il *routing* di una RIP di tipo 1 viene esteso al nucleo. Inoltre, abbiamo dimostrato che la saporina è in grado di indurre il danno nucleare, attraverso la sua attività enzimatica PNAG, suggerendo che il danno al DNA potrebbe essere un meccanismo attraverso il quale la RIP innesca la morte cellulare, per esempio attivando l'apoptosi DNA-dipendente (Polito *et al.*, 2009).

In questo caso, l'azione della saporina può essere paragonata a quella della ricina, anch'essa in grado di danneggiare il DNA delle cellule endoteliali (Brigotti *et al.*, 2002).

## **Capitolo 5**

# **Risultati e Discussioni**

## **STUDI SU LANCEOLINA E STENODACTILINA**



## CITOTOSSICITÀ E *ROUTING* INTRACELLULARE DI LANCEOLINA E STENODACTILINA

Le RIP bicatenarie estratte dalle piante appartenenti alla famiglia delle Adenie sono risultate estremamente citotossiche. Allo scopo di spiegare l'elevata citotossicità riscontrata, sono stati eseguiti saggi che permettono di studiare i meccanismi di intossicazione e il *routing* intracellulare della lanceolina e della stenodactilina, isolate rispettivamente da *A. lanceolata* e *A. stenodactyla* (Pelosi *et al.*, 2005; Stirpe *et al.*, 2007).

### 5.1 PROPRIETÀ ENZIMATICHE DI LANCEOLINA E STENODACTILINA: EFFETTI SULLA SINTESI PROTEICA

Uno degli obiettivi di questa tesi è stato quello di indagare sulla capacità citotossica di lanceolina e stenodactilina, due RIP bicatenarie, estratte nel nostro laboratorio, rispettivamente da *A. lanceolata* e *A. stenodactyla* (Pelosi *et al.*, 2005; Stirpe *et al.*, 2007).

Una prima valutazione dell'attività enzimatica della lanceolina e della stenodactilina è stata effettuata *in vitro*, mediante la determinazione dell'inibizione della sintesi proteica. Quest'ultima è stata valutata come incorporazione di <sup>3</sup>H-leucina in un sistema acellulare costituito da lisato di reticolociti di coniglio. Le due proteine sono state saggiate sia in forma nativa (tossina bicatenaria), sia in seguito a riduzione del ponte disolfuro (tossina ridotta). Questo permette di determinare se la tossicità delle due RIP viene alterata dalla catena B, che potrebbe provocare un ingombro sterico ostacolando il legame della catena attiva al substrato (tabella 2).

**Tabella 2.** I valori di IC<sub>50</sub> sono stati calcolati per la forma ridotta e non ridotta delle due RIP. La sintesi proteica è stata valutata mediante misurazione della radioattività incorporata dalle proteine. L'IC<sub>50</sub> (concentrazione che inibisce il 50% della sintesi proteica) è stata calcolata mediante regressione lineare.

IC <sub>50</sub>	NATIVA	RIDOTTA
LANCEOLINA	5.2µg/ml ( $8.7 \times 10^{-8}$ M)	1.1µg/ml ( $1.8 \times 10^{-8}$ M)
STENODACTILINA	5.6µg/ml ( $8.7 \times 10^{-8}$ M)	0.5µg/ml ( $8.3 \times 10^{-9}$ M)
VOLKENSINA (*)	5.0µg/ml ( $8.4 \times 10^{-8}$ M)	0.022µg/ml ( $3.7 \times 10^{-10}$ M)
RICINA (*)	5.0µg/ml ( $8.4 \times 10^{-8}$ M)	0.006µg/ml ( $1.0 \times 10^{-10}$ M)

(\*) dalla rassegna Barbieri *et al.*, 1993

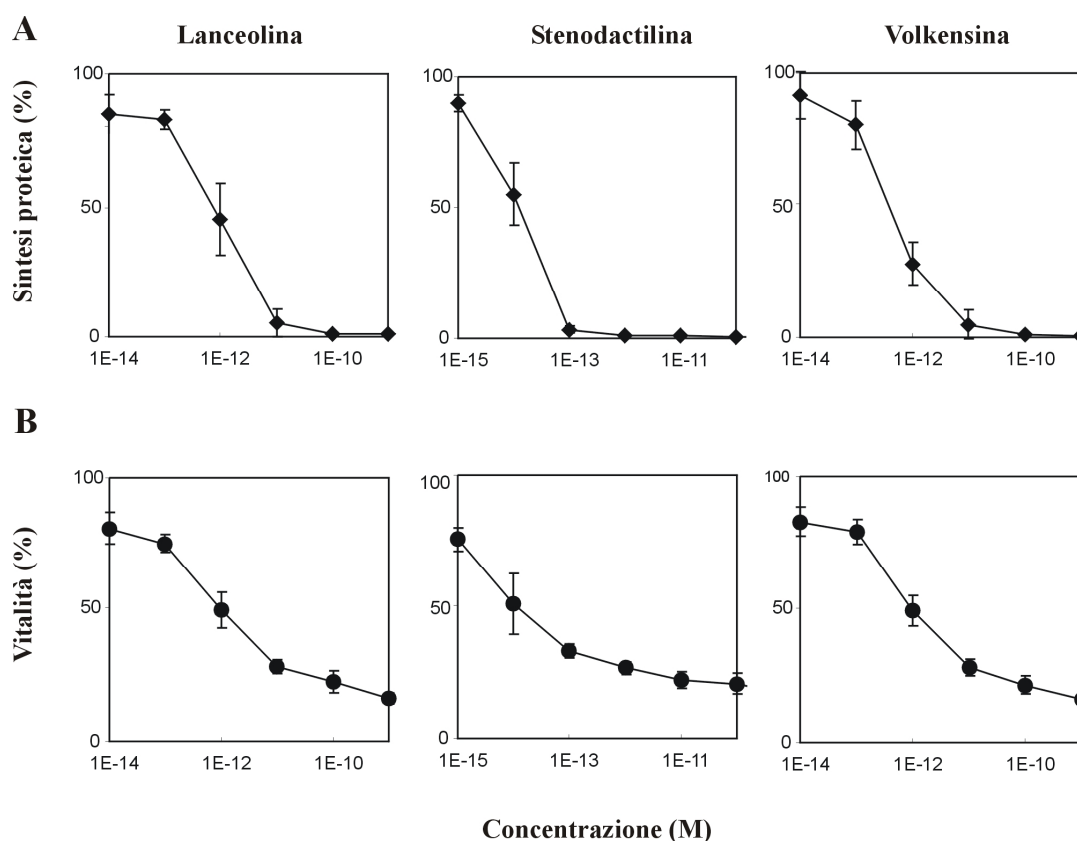
Come si può osservare dai valori riportati in tabella 2, entrambe le RIP native sono in grado di inibire la sintesi proteica in un sistema *cell-free* con valori di IC<sub>50</sub> confrontabili con quelli di ricina e volkensina (dalla rassegna Barbieri *et al.*, 1993). Quest'ultima è stata estratta, come la lanceolina e la stenodactilina, da una pianta appartenente al genere *adenia* (*A. volkensii*) ed è una tossina molto potente sia sulle cellule che sugli animali (Battelli *et al.*, 2004).

Come precedentemente dimostrato per altre RIP bicateinarie (vedi rassegna Barbieri *et al.*, 1993), anche le forme ridotte della lanceolina e della stenodactilina hanno mostrato un'IC<sub>50</sub> minore rispetto a quella riscontrata per le forme native. Questo dato indica che la catena lectinica, nel sistema *cell-free*, crea un ingombro sterico intorno alla catena attiva, impedendone parzialmente l'attività enzimatica. Tuttavia, osservando i risultati relativi alla volkensina e alla ricina, riportati in tabella 2, si osserva che nel caso di queste RIP la differenza tra l'IC<sub>50</sub> della forma nativa e della forma ridotta è molto più accentuata. Questo potrebbe essere spiegato considerando le modalità sperimentali usate per la riduzione del ponte disolfuro di lanceolina e stenodactilina. Infatti, nel caso di queste due RIP, è stato necessario usare tecniche di riduzione più forti (vedi Materiali e Metodi) che potrebbe averne provocato una parzialmente inattivazione.

## 5.2 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI CITOTOSSICI DELLE RIP: INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA E DELLA VITALITÀ IN CELLULE HELA

La citotossicità della lanceolina e della stenodactilina è stata valutata come capacità di inibire la sintesi proteica e la vitalità in cellule HeLa.

Le cellule sono state trattate con concentrazioni scalari di RIP (da  $10^{-15}$  a  $10^{-9}$  M) per 24 ore e successivamente sono state determinate la sintesi proteica e la vitalità cellulare, rispettivamente mediante incorporazione di  $^3\text{H}$ -leucina e come misurazione del formazano prodotto dalle cellule vive (vedi Materiali e Metodi). Gli effetti della lanceolina e della stenodactilina sono stati confrontati con quelli precedentemente ottenuti per la volkensina.



**Figura 21. (A) Sintesi proteica (■) e (B) vitalità in cellule HeLa (●).**

Le cellule sono state incubate continuamente per 24 ore con le RIP e in seguito è stata misurata la percentuale di sintesi proteica o la vitalità, rispetto ai controlli. La sintesi proteica è stata valutata come incorporazione di  $^3\text{H}$ -leucina e la vitalità come misurazione del formazano prodotto dalle cellule vive. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e la deviazione standard è risultata sempre inferiore al 12%. In ordinata è riportata la sintesi proteica o la vitalità, mentre in ascissa sono indicati i valori di concentrazioni molarie di RIP usate.

Dalle curve dose-risposta, riportate in figura 21A, si evince che tutte le RIP saggiate sono efficaci nell'inibire la sintesi proteica nella linea cellulare utilizzata. La lanceolina e la volkensina mostrano una capacità di inibizione della sintesi proteica molto simile e sono in grado di inibire completamente la sintesi proteica alla concentrazione di  $10^{-11}$  M. La stenodactilina risulta maggiormente attiva rispetto alle altre due RIP, infatti l'inibizione totale della proteino-sintesi si ha già alla concentrazione di  $10^{-13}$  M.

Il valore di  $IC_{50}$  (tabella 3) ottenuto per la lanceolina e per la volkensina è circa uguale, e risulta inferiore di due ordini di grandezza rispetto a quello calcolato per la stenodactilina.

I dati ottenuti mostrano come la stenodactilina sia la RIP più potente delle tre saggiate. Questo dato è stato confermato anche da esperimenti condotti nel nostro laboratorio su altre linee cellulari.

L'inibizione della sintesi proteica è considerata come il meccanismo patogenetico attraverso il quale la cellula intossicata dalle RIP, sia di tipo 1 che di tipo 2, va incontro a morte. Per verificare la correlazione tra inibizione della sintesi proteica e morte cellulare, sono stati eseguiti saggi di vitalità cellulare, nelle stesse condizioni utilizzate negli esperimenti di inibizione della sintesi proteica appena illustrati.

Come si può notare, confrontando i grafici della figura 21, l'inibizione della sintesi proteica è un evento più precoce rispetto alla morte, in cellule trattate per 24 ore in presenza di lanceolina, stenodactilina o volkensina. L'effetto si nota soprattutto alle concentrazioni più alte, quando si ha già una forte inibizione della sintesi proteica. In nessuno dei casi si assiste all'inibizione completa della vitalità cellulare infatti, dopo 24 ore di trattamento, circa il 20% delle cellule risulta ancora vitale. Tuttavia, le RIP saggiate sono in grado di inibire del 75% la vitalità cellulare, già alla concentrazione di  $10^{-12}$  M per la stenodactilina e di  $10^{-11}$  M per lanceolina e volkensina. La percentuale di cellule che rimane vitale in seguito al trattamento non è

resistente all'azione della RIP. Infatti, continuando il trattamento per 78 ore si assiste alla morte di tutte le cellule (dato non mostrato).

Dalle curve di citotossicità sono state calcolate, mediante regressione lineare, le dosi che portano ad un dimezzamento del numero di cellule vitali ( $LD_{50}$ ).

Dal confronto tra  $IC_{50}$  e  $LD_{50}$  risulta che la stenodactilina è sicuramente più tossica rispetto alla lanceolina e alla volkensina e che il valore di  $IC_{50}$  e  $LD_{50}$  è circa lo stesso per ciascuna RIP.

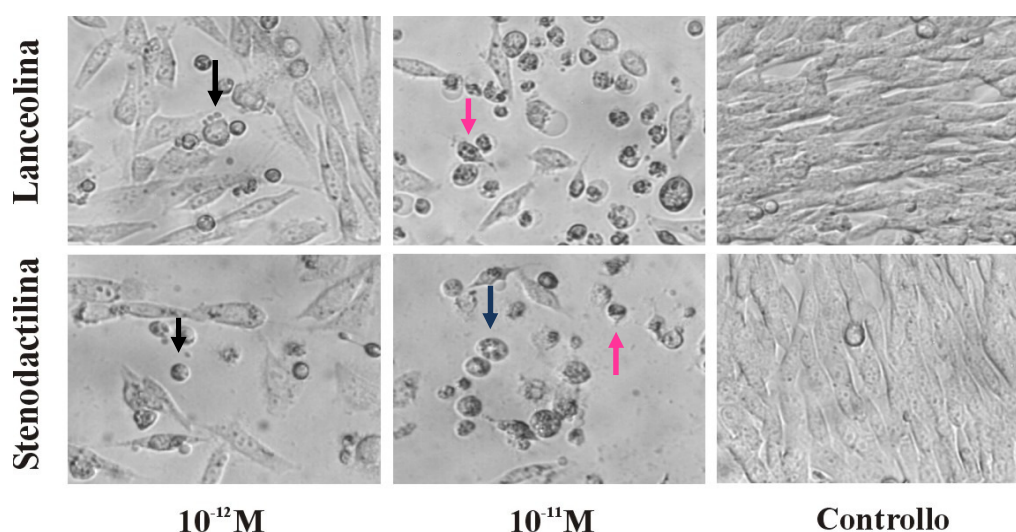
**Tabella 3.** Confronto tra i valori di  $IC_{50}$  e di  $LD_{50}$  calcolati per le RIP lanceolina, stenodactilina e volkensina in cellule HeLa. L' $IC_{50}$  (concentrazione che inibisce il 50% della sintesi proteica) e l' $LD_{50}$  (concentrazione di RIP necessaria per ridurre del 50% la vitalità cellulare) sono state calcolate mediante regressione lineare.

	$IC_{50}$ (M)	$LD_{50}$ (M)
LANCEOLINA	$1.5 \times 10^{-12}$	$3.7 \times 10^{-12}$
STENODACTILINA	$1.9 \times 10^{-14}$	$5.4 \times 10^{-14}$
VOLKENSINA	$1.1 \times 10^{-12}$	$3.8 \times 10^{-12}$

### 5.3 PROPRIETÀ APOPTOTICHE DI LANCEOLINA E STENODACTILINA

I risultati appena descritti lasciano pensare che le RIP agendo sulla sintesi proteica, provocano il blocco della produzione di proteine e il successivo innesco della morte cellulare. Tuttavia, le RIP bicatenarie, in virtù della loro catena B potrebbero innescare processi di morte cellulare programmata anche attraverso altri meccanismi, per esempio attivando la cascata apoptotica tramite la via estrinseca (Polito *et al.*, 2009).

Analizzando morfologicamente le cellule trattate con lanceolina o stenodactilina per 24 ore è stato verificato l'effettivo coinvolgimento dell'apoptosi nella morte cellulare indotta dalle due RIP.



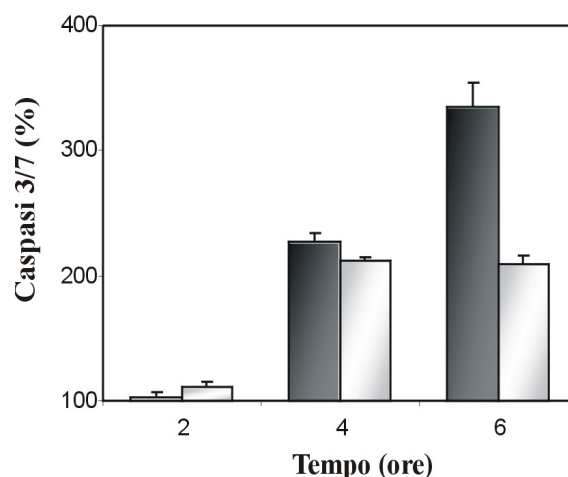
**Figura 22. Morfologia di cellule HeLa esposte a lanceolina o stenodactilina.**

Le cellule sono state incubate per 24 h con le RIP ( $10^{-11}$  e  $10^{-12}$  M) e osservate con un microscopio a contrasto di fase. Le frecce evidenziano le seguenti alterazioni: cellule piccole e sferiche (freccie nere), nucleo eterocromatico (freccia fucsia) e parzialmente frammentato (freccia blu).

Osservando la figura 22, è possibile notare che già alla concentrazione di  $10^{-12}$  M, si individua la presenza di cellule che mostrano le caratteristiche morfologiche classiche dell'apoptosi. Infatti, le cellule hanno una forma sferica (freccia nera) e dimensioni ridotte ed il nucleo risulta eterocromatico (freccia fucsia) o parzialmente frammentato (freccia blu), come conseguenza della condensazione e degradazione della cromatina. Gli

aspetti morfologici delle cellule HeLa esposte alla lanceolina e stenodactilina sono caratteristici del danno cellulare di tipo apoptotico.

Alla luce di queste osservazione, è stata valutata la capacità delle due RIP di indurre apoptosi mediante la misurazione dell'attivazione delle caspasi 3/7. Queste rappresentano le principali caspasi effettrici su cui confluiscono sia la via estrinseca che la via intrinseca di attivazione caspasica, inducendo le fasi finali dell'apoptosi. Per valutare l'attivazione delle caspasi è stato usato un saggio luminescente che genera un segnale proporzionale all'attivazione delle caspasi 3/7 (vedi Materiali e Metodi). L'esperimento è stato condotto a tempi brevi, poiché questi enzimi vengono attivati precocemente nelle cellule.



**Figura 23. Attivazione delle caspasi 3/7 in cellule HeLa trattate con lanceolina e stenodactilina.**

L'esperimento è condotto utilizzando la lanceolina (barre bianche) e la stenodactilina (barre grigie) alla concentrazione  $10^{-13}$  M, dose già in grado di indurre le alterazioni morfologiche dell'apoptosi. L'intossicazione era ottenuta, ai tempi indicati, tramite incubazione continua. I risultati sono espressi come percentuale dei controlli incubati in assenza di RIP. I valori riportati sono la media di tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

Come si evince dalla figura 23, entrambe le RIP saggiate provocano attivazione della caspasi 3/7, ed in modo particolare la stenodactilina. L'attivazione caspasica risulta già significativa dopo solo 4 ore di incubazione con le RIP. L'elevata tossicità della lanceolina e della stenodactilina potrebbe, quindi, dipendere non solo dall'inibizione delle sintesi proteiche causata dalle due tossine, ma anche dalla loro capacità di

indurre apoptosi. I due processi citotossici potrebbero agire in maniera sinergica per provocare la morte delle cellule trattate.

#### **5.4 INTERAZIONE CON LE CELLULE E *TURNOVER* INTRACELLULARE DI LANCEOLINA E STENODACTILINA**

Prima della purificazione e del successivo studio delle capacità citotossiche di lanceolina e stenodactilina, era la volkensina ad essere considerata la RIP più tossica tra quelle note. I risultati appena descritti hanno dimostrato che la lanceolina ha una capacità citotossicità pari a quella della volkensina e che la stenodactilina è addirittura più tossica delle prime due.

L'elevata citotossicità di lanceolina e stenodactilina ha indotto ad indagare il destino intracellulare delle due RIP, con lo scopo di individuare eventuali differenze con le altre proteine della stessa famiglia in grado di giustificare la diversa tossicità (per esempio con la ricina, il cui *routing* è ampiamente conosciuto).

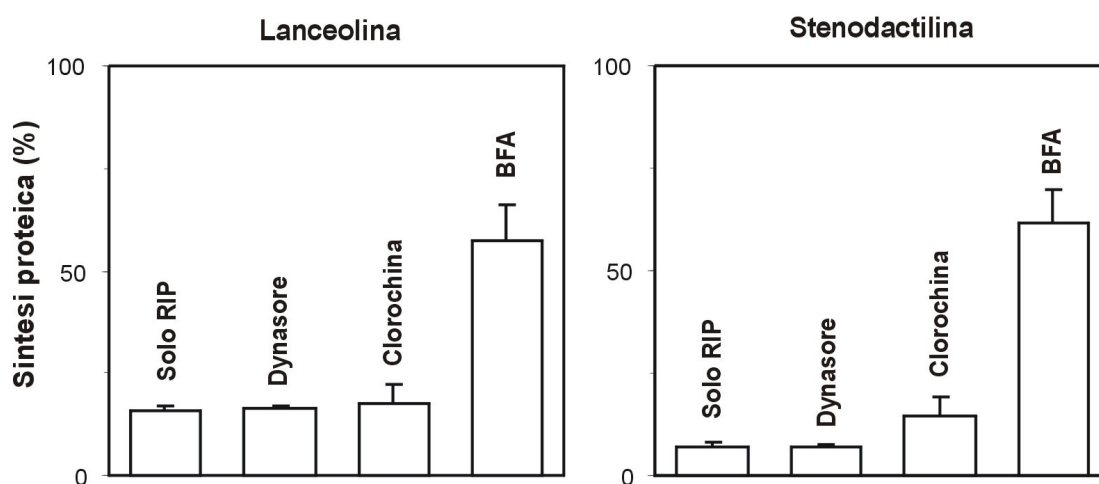
##### **5.4.1 ENDOCITOSI E ROUTING INTRACELLULARE**

Per valutare le modalità di ingresso di lanceolina e stenodactilina all'interno della cellula, è stata analizzata la loro citotossicità in termini di inibizione della sintesi proteica cellulare in presenza di dynasore.

Il dynasore blocca l'endocitosi clatrina-dipendente (Soriano *et al.*, 2010), per cui un aumento della percentuale di sintesi proteica nei campioni trattati con la RIP in presenza di dynasore indicherebbe che, almeno in parte, l'endocitosi della RIP avviene tramite le vescicole di clatrina. I risultati ottenuti (figura 24) per le due RIP sono analoghi. Infatti, sia per la lanceolina che per la stenodactilina, le percentuali di sintesi proteica non variano in assenza e in presenza di dynasore. Questi risultati indicano che l'ingresso della lanceolina e della stenodactilina all'interno delle cellule non coinvolge il meccanismo di endocitosi clatrina-dipendente.



Queste RIP quindi, potrebbero entrare tramite meccanismi non legati ad un unico recettore ma, come avviene per altre RIP di tipo 2, attraverso il legame della catena B ai residui di galattosio presenti sulle glicoproteine e sui glicolipidi della membrana cellulare, processo di endocitosi che può avvenire indipendentemente dalla clatrina. Infatti, bloccando le molecole glisilate di membrana con l'aggiunta di galattosio (vedi paragrafo 5.4.2.1), è stato osservato che le RIP non provocano la riduzione della vitalità.



**Figura 24. Effetto di sostanze che interferiscono con l'endocitosi e con il routing intracellulare, sull'inibizione della sintesi proteica da parte di lanceolina e stenodactilina.**

Le cellule sono state dapprima preincubate con dynasore, clorochina o brefeldina A (BFA) e successivamente trattate per 4 ore con le RIP alla concentrazione di  $10^{-10}$  M (vedi Materiali e Metodi).

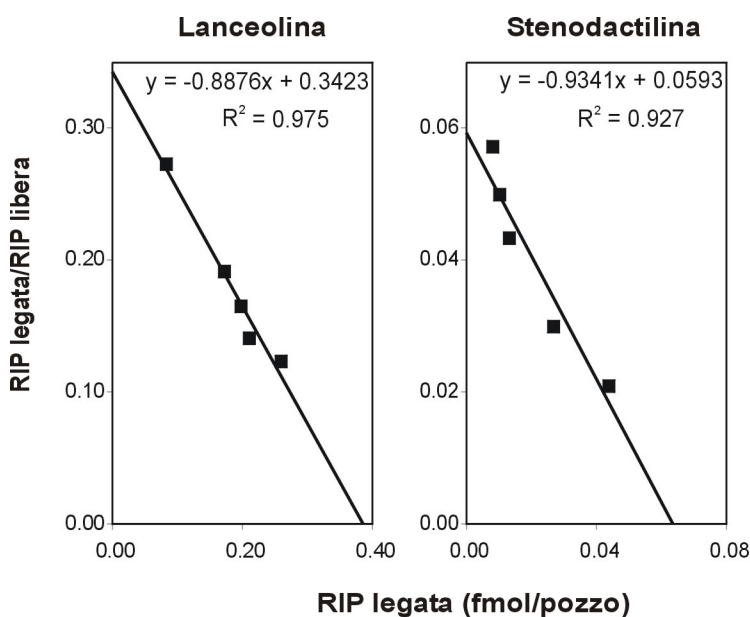
In ordinata è riportata la sintesi proteica misurata mediante l'incorporazione della leucina radioattiva ed espressa come percentuale rispetto ai controlli. I valori riportati sono la media di tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard. La sintesi proteica delle colture cellulari trattate solo con dynasore, clorochina o BFA non è scesa oltre il 20% rispetto a quella delle cellule di controllo.

Come primo approccio verso lo studio del *routing* intracellulare di lanceolina e stenodactilina è stata analizzata l'eventuale variazione delle loro capacità citotossiche in presenza di brefeldina (BFA) (Vago *et al.*, 2005) o clorochina (Ippoliti *et al.*, 1998). La BFA è un metabolita fungino che destabilizza il complesso del Golgi, interferendo con il trasporto anterogrado di proteine dal reticolo endoplasmatico verso le cisterne del *cis*-Golgi, mentre la clorochina è un agente lisosomotropo che si accumula nei

lisosomi aumentandone il pH e viene comunemente usato per indagare il loro ruolo nei processi cellulari. I risultati (figura 24) evidenziano un potenziale coinvolgimento dell'apparato del Golgi nel destino intracellulare sia della lanceolina che della stenodactilina. Infatti, le percentuali della sintesi proteica aumentano significativamente quando ai campioni viene aggiunta la BFA, passando dal 15.6% al 57.4% nel caso della lanceolina e dal 6.8% al 61.4% per la stenodactilina. Il trattamento con la cloroquina non ha dato lo stesso effetto protettivo (figura 24). Infatti, nel caso della lanceolina la percentuale passa dal 15.6% al 17.3% nei campioni trattati con cloroquina; mentre per la stenodactilina la percentuale di sintesi proteica passa dal 6.8% al 14.4%. Il mancato effetto protettivo della cloroquina lascia supporre che durante il *routing* intracellulare, la quota delle due RIP che raggiunge i lisosomi non partecipa alla loro tossicità.

#### 5.4.2 BINDING CELLULARE

Il numero di siti di legame alla membrana cellulare e l'affinità del legame recettore-ligando sono stati valutati esponendo le cellule a concentrazioni scalari di lanceolina e stenodactilina marcate con  $^{125}\text{I}$ .



**Figura 25. Analisi di Scatchard.**

Le cellule sono state incubate con concentrazioni scalari di lanceolina o stenodactilina iodinate per 1 ora a 0 °C. Il legame aspecifico alla membrana è stato determinato trattando le cellule con lattosio e la radioattività associata è stata misurata al  $\gamma$ -counter. I risultati sono la media di due esperimenti.

Attraverso l'analisi Scatchard è stato determinato il numero di siti di legame cellulari, che sono risultati  $8.24 \times 10^4$  e  $3.80 \times 10^5$  (tabella 4) rispettivamente per la lanceolina e per la stenodactilina. Questi valori sono paragonabili, soprattutto nel caso della stenodactilina, a quanto calcolato precedentemente nel nostro laboratorio per la volkensina.

**Tabella 4.** Numero di siti di legame alla membrana per cellula e costante di dissociazione ( $K_d$ ) ligando-recettore.

RIP	Siti di legame per cellula	$K_d$ (M)
LANCEOLINA	$8.24 \times 10^4$	$2.13 \times 10^{-11}$
STENODACTILINA	$3.80 \times 10^5$	$1.77 \times 10^{-12}$
VOLKENSINA (*)	$2.30 \times 10^5$	$9.89 \times 10^{-11}$
RICINA (*)	$3.30 \times 10^7$	$3.00 \times 10^{-8}$

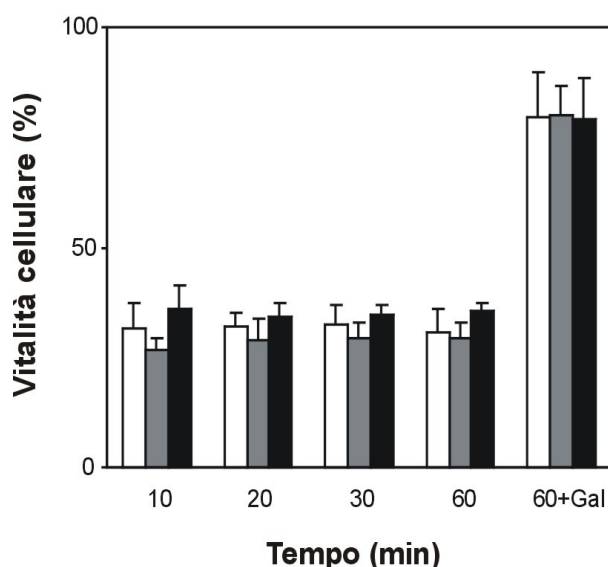
(\*) Battelli *et al.*, 2004

Comparando i dati sopracitati con quelli relativi alla ricina (Battelli *et al.*, 2004), si osserva che quest'ultima ha un numero di siti di legame alla membrana due volte superiore a quello della stenodactilina e tre volte superiore rispetto alla lanceolina. Questo risultato indica che la maggiore citotossicità della lanceolina e della stenodactilina rispetto alla ricina non è dovuta al numero di siti di legame alla membrana. La mancanza di correlazione tra il numero di siti di legame e la citotossicità potrebbe essere spiegata dal destino intracellulare delle RIP, che potrebbero, per esempio, essere riciclate intatte verso la superficie cellulare, conservando le loro capacità citotossiche.

La costante di dissociazione recettore-ligando è  $2.13 \times 10^{-11}$  M per la lanceolina e  $1.77 \times 10^{-12}$  M per la stenodactilina, dimostrando un'elevata affinità di legame. Questi dati sono molto paragonabili a quelli ottenuti per la volkensina, di cui è stata calcolata una costante di dissociazione di  $9.89 \times 10^{-11}$  M (vedi tabella 4).

#### 5.4.2.1 EFFICACIA DI BINDING

Per indagare sull'efficienza e sulla velocità di legame della lanceolina e della stenodactilina alla membrana, è stato condotto un saggio di vitalità trattando le cellule con RIP a 0 °C per tempi molto brevi, da 10 a 60 minuti. Questo saggio è stato condotto anche per la volkensina.



**Figura 26. Efficacia di legame alla membrana.**

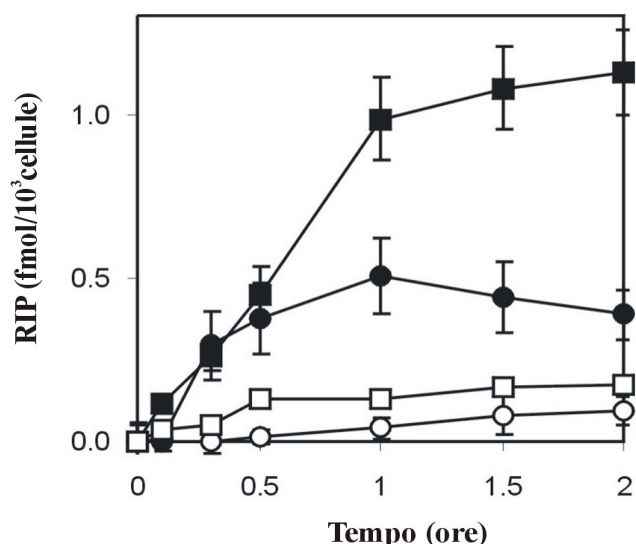
Le cellule sono state incubate a 0 °C per i tempi indicati con lanceolina (10<sup>-9</sup> M, colonne bianche), stenodactilina (10<sup>-10</sup> M, colonne grigie) o volkensina (10<sup>-9</sup> M, colonne nere). In parallelo, alcuni pozzi sono stati incubati con galattosio a 37 °C per 1 ora e successivamente trattate per 60 minuti con le RIP a 0 °C. In tutti i casi, dopo il trattamento a freddo, le cellule sono state incubate in assenza di RIP per 24 ore a 37 °C, prima di effettuare il saggio di valutazione della vitalità cellulare (vedi materiali e Metodi). I risultati sono espressi come percentuale rispetto ai controlli. I valori riportati sono la media di tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

Dalla figura sopra riportata si evince che tutte le RIP saggiate legano molto rapidamente la membrana cellulare. Infatti, già dopo 10 minuti di incubazione la vitalità cellulare risulta inibita di circa il 60% e la percentuale di vitalità risulta invariata aumentando l'esposizione a 60 minuti.

Le colture cellulari pre-incubate con galattosio, mostrano una percentuale di vitalità intorno all'80%; ciò conferma che la tossicità dipende dall'ingresso della RIP mediato dalla catena B.

### 5.4.3 UPTAKE CELLULARE

Il legame alla membrana e l'*uptake* cellulare della lanceolina e della stenodactilina, sono stati valutati nel tempo trattando le cellule con le due RIP iodinate.



**Figura 27. Uptake cellulare di lanceolina e stenodactilina in cellule HeLa.**

Il legame alla membrana (simboli vuoti) e l'accumulo intracellulare (simboli neri) della lanceolina (○, ●) e della stenodactilina (□, ■) sono stati determinati in seguito ad un'incubazione a 37 °C ai tempi indicati in presenza delle due RIP iodinate alla concentrazione di  $5 \times 10^{-8}$  M. La RIP associata alla membrana è stata estratta usando un tampone a pH acido, e successivamente per risalire alla quantità di RIP intracellulare, le cellule sono state lisate con KOH (vedi Materiali e Metodi). Il valore di radioattività è stato rilevato al  $\gamma$ -counter. I valori riportati sono la media di tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

Dai risultati si evince che le due RIP saturano i recettori di membrana molto rapidamente, che l'accumulo intracellulare di lanceolina e stenodactilina raggiunge un *plateau* dopo solo 1 ora di incubazione e che il *turnover* dei recettori è molto veloce. La quantità di stenodactilina associata alla membrana e quella intracellulare sono circa 2 e 3 volte maggiori rispetto al valore riscontrato per la lanceolina (tabella 5). Questo potrebbe in parte giustificare la maggiore tossicità della stenodactilina rispetto alla lanceolina.

**Tabella 5.** Quantità di RIP associata alla membrana ed intracellulare per cellula. Per i dati relativi alla volkensina: Battelli *et al.*, 2004.

RIP	Associata alla membrana	Intracellulare
	Fmol/10 <sup>3</sup> cellula	
LANCEOLINA	91.5	387.3
STENODACTILINA	175.0	1127.6
VOLKENSINA (*)	15.4	38.0

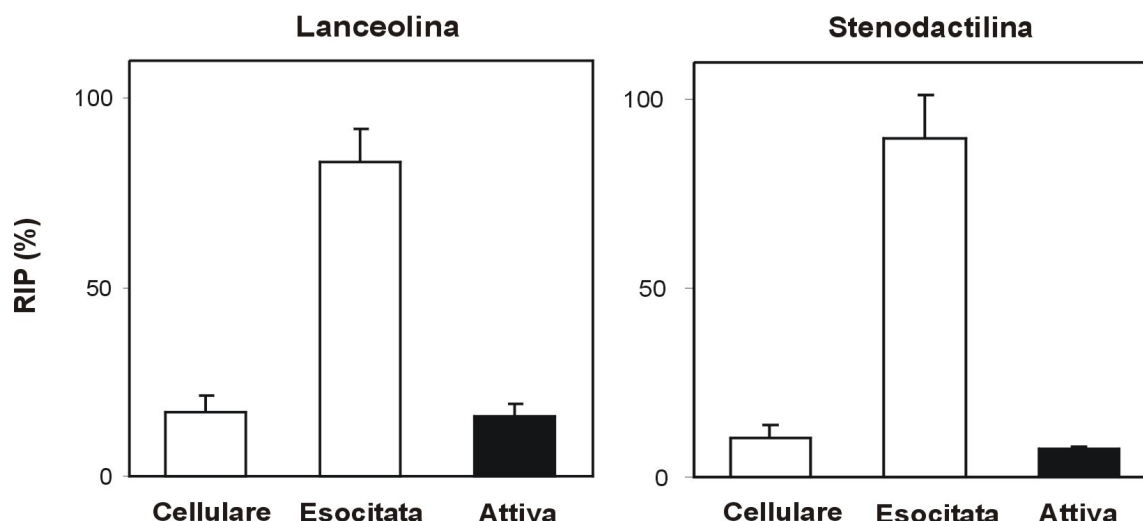
(\*) Battelli *et al.*, 2004

Per quanto riguarda la volkensina, la quantità di proteina associata alla membrana è circa 11 volte minore rispetto alla stenodactilina e 6 volte minore rispetto alla lanceolina. Differenze anche superiori, sempre nella stessa direzione si osservano per la quantità di RIP intracellulare. Questo dato potrebbe spiegare la maggiore citotossicità della stenodactilina rispetto alla volkensina, il cui valore di  $IC_{50}$  sulle cellule HeLa è risultato  $1.1 \times 10^{-12}$  M, ben due ordini di grandezza inferiore rispetto al valore di  $IC_{50}$  della stenodactilina (vedi tabella 3).

Complessivamente gli esperimenti di *binding* e *uptake* fin qui esposti mostrano che la citotossicità di queste RIP è molto elevata benché il numero di siti di legame sia fra i più bassi riportati in letteratura per le RIP tipo 2 altamente tossiche. D'altra parte la velocità del *turnover* dei recettori cellulari è elevata, come pure l'efficienza del legame. Insieme queste caratteristiche favoriscono un buon livello di accumulo intracellulare e le differenze tra lanceolina e stenodactilina a questo riguardo possono giustificare la differenza di tossicità tra le due.

#### 5.4.4 ESOCITOSI

Ulteriori studi sono stati condotti per valutare la quantità di lanceolina e stenodactilina esocitata e l'eventuale attività residua. Acidificando e centrifugando il sopranatante di cellule trattate con le due RIP iodinate è possibile scindere la frazione acido solubile, che contiene le proteine degradate, dal *pellet* in cui si trova la componente proteica ancora integra (vedi Materiali e Metodi).



**Figura 28. Esocitosi di lanceolina e stenodactilina e attività residua.**

Le cellule sono state trattate per 1 ora a 0 °C con le RIP iodinate alla concentrazione di  $5 \times 10^{-8}$  M, lavate e incubate per ulteriori 2 ore a 37 °C.

Le colonne bianche rappresentano la percentuale di RIP associata alla membrana cellulare e la percentuale totale di RIP esocitata dalla cellula (sia integra, che degradata). La colonna nera rappresenta la percentuale di RIP esocitata ancora enzimaticamente attiva. L'attività residua è stata valutata tramite un saggio di inibizione della sintesi proteica cellulare. La concentrazione proteica attiva è stata ottenuta per estrapolazione da una curva standard di inibizione della sintesi proteica a concentrazioni note di RIP.

I valori riportati sono la media di due esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

Dalla figura 28 si nota che sia la percentuale di RIP associata alla cellule che la percentuale di proteina ancora attiva dopo esocitosi, è, benché limitatamente, maggiore per la lanceolina rispetto alla stenodactilina.

Tuttavia, analizzando i valori proteici assoluti calcolati sulla base della radioattività rilevata (tabella 6), si evidenzia una quantità di stenodactilina

associata alle cellule ed esocitata integra decisamente superiore rispetto a quanto riscontrato per la lanceolina e per la volkensina. Questi dati suggeriscono un più rapido *turnover* della stenodactilina rispetto alle altre due RIP, confermando le osservazioni fatte nello studio *dell'uptake*. Inoltre questi risultati suggeriscono che la quota di stenodactilina ancora attiva dopo l'esocitosi possa essere rapidamente riciclata e internalizzata da altre cellule, che ne vengono intossicate, giustificando la maggiore citotossicità rispetto alle altre due RIP.

**Tabella 6.** Quantità di RIP associata alla membrana, esocitata totale ed integra e quota di RIP ancora attiva in seguito ad esocitosi.

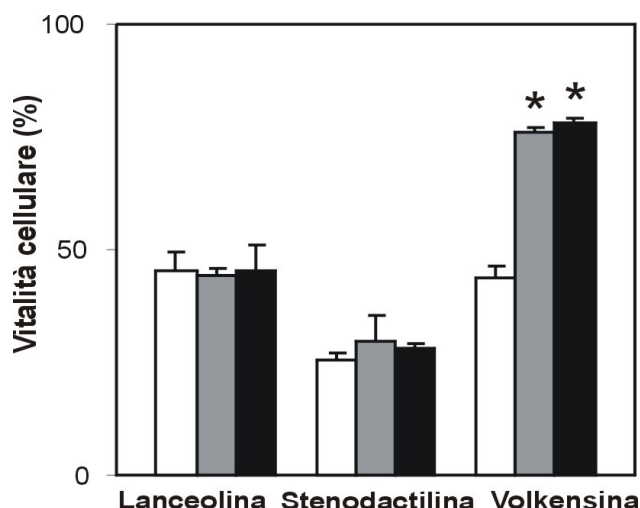
RIP	fmol/10 <sup>6</sup> cellule	Associata alle cellule	Totale esocitata	Esocitata integra	Attiva
LANCEOLINA		26.4±4.9	129.0±4.0	76.3±4.9	20.1±3.1
STENODACTILINA		41.1±8.6	310.6±31.0	196.4±28.3	23.2±5.8
VOLKENSINA (*)		17.7±1.3	118.4±6.4	102.5±8.3	58.3±5.5

(\*) Battelli *et al.*, 2004



## 5.5 RESISTENZA ALLA DEGRADAZIONE PROTEOLITICA

I risultati degli studi sull'esocitosi ci hanno spinto ad indagare sulla resistenza delle RIP in esame alla degradazione proteolitica, in quanto la citotossicità delle RIP dipende in parte anche dalla loro capacità di aggirare i vari meccanismi di degradazione e raggiungere il bersaglio intracellulare.



**Figura 29. Resistenza delle RIP alla degradazione proteolitica.**

La reazione di taglio è stata condotta miscelando in provetta la RIP e l'enzima (tripsina o chimotripsina) a concentrazioni equimolari. Le RIP trattate sono state usate per eseguire un esperimento di vitalità cellulare a 24 ore (vedi Materiali e Metodi), confrontandone l'efficienza citotossica con quella delle RIP native. Le colonne bianche rappresentano l'azione dovuta alle RIP native, quelle grigie e nere rappresentano rispettivamente l'azione delle RIP trattate con tripsina e con chimotripsina.

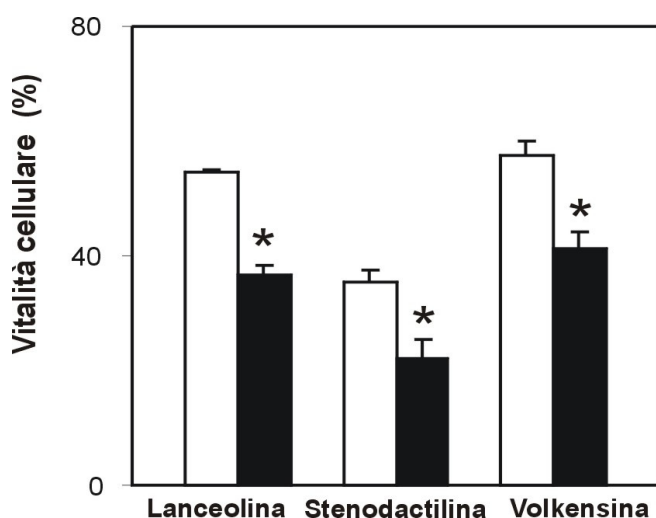
Gli asterischi indicano la significatività statistica, ottenuta tramite test di ANOVA, tra la vitalità delle cellule trattate con RIP native o sottoposte a restrizione proteolitica. I valori riportati sono la media di tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

e

La percentuale di vitalità calcolata nei campioni cellulari intossicati con le RIP lanceolina e stenodactilina pretrattate con tripsina o chimotripsina è risultata analoga a quella di cellule trattate con le RIP native, dimostrando un grado elevato di resistenza all'azione proteolitica di questi due enzimi. Questo risultato è in accordo con il fatto che circa il 60 % della lanceolina e della stenodactilina esocitate viene trovato integro. Quanto detto non è valido per la volkensina che, benchè venga trovata integra dopo l'esocitosi per una percentuale superiore alle altre due RIP, è risultata ben più sensibile all'attività proteolitica di tripsina e chimotripsina, infatti l'azione delle due proteasi ne diminuisce di circa il 50% la capacità citotossica.

La discrepanza tra la sensibilità agli enzimi proteolitici e la percentuale di RIP esocitata integra ci ha spinto a valutare altri meccanismi di degradazione più tipicamente presenti nelle cellule.

Nel citosol è attiva la via proteolitica proteasomale, che attraverso l'azione di enzimi ubiquitinanti destina molte proteine, sia endogene che esogene, alla degradazione proteasomale. Per valutare la percentuale di lanceolina, stenodactilina e volkensina soggetta a degradazione proteasomale, le cellule HeLa sono state pretrattate con un inibitore del proteasoma e successivamente intossicate con le due RIP.



**Figura 30. Ruolo del proteasoma nel routing della lanceolina e della stenodactilina.**

Le cellule sono state pre-incubate per 1 ora in presenza di un inibitore del proteasoma e successivamente trattate con le RIP ( $10^{-13}$  M). Dopo 24 ore è stato eseguito il saggio per valutare la percentuale di vitalità cellulare. Gli asterischi indicano la significatività statistica, ottenuta tramite test di ANOVA, osservata tra le cellule trattate con le RIP in assenza (colonne bianche) o in presenza (colonne nere) dell'inibitore del proteasoma. I risultati sono espressi come percentuale dei controlli incubati in assenza di RIP. I valori riportati sono la media di tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

I risultati evidenziano che in presenza dell'inibitore del proteasoma (figura 30, colonne nere), l'attività citotossica è significativamente maggiore per tutte le RIP testate. Questi dati indicano che una certa quota di lanceolina, stenodactilina e volkensina è soggetta alla degradazione proteasomale, per cui il destino intracellulare di una percentuale delle RIP internalizzate è l'ubiquitinazione e la successiva demolizione, senza mostrare significative differenze tra le tre RIP. Pertanto, benché resistenti all'attività di tripsina e chimotripsina, anche lanceolina e stenodactilina sono soggette all'azione degli enzimi proteolitici proteasomali.

# Capitolo 6

## Conclusioni

Le RIP sono enzimi depurinanti, molto diffusi nel regno vegetale e studiati da molte decine di anni. Nonostante le numerose ricerche a riguardo, ancora oggi rimangono tanti punti da chiarire circa la biologia di queste proteine. La linea di ricerca sviluppata in questa tesi ha avuto due obiettivi fondamentali: (i) chiarire il *routing* intracellulare della saporina e (ii) approfondire lo studio di lanceolina e stenodactilina, due RIP molto potenti di recente scoperta.

**Gli studi sulla saporina** hanno portato ad una ricostruzione del suo traffico intracellulare. Attraverso esperimenti di microscopia confocale ed elettronica è stato osservato che la saporina viene endocitata, tramite meccanismi non recettoriali, e segue il destino intracellulare degli endosomi, che vanno incontro a maturazione modificandosi in endosomi tardivi che confluiscono in diverse strutture vescicolari. Ciò consente alla RIP di raggiungere più di un compartimento subcellulare. Infatti la saporina è stata localizzata nelle cisterne perinucleari del RER, nel TNG e in alcuni casi nel nucleo. I dati relativi alla presenza della saporina nel nucleo e alla sua azione sul DNA, pur essendo preliminari, aprono le porte a molte nuove domande circa i meccanismi citotossici usati dalla RIP per indurre la morte cellulare. L'approdo della saporina nel nucleo implica la possibilità per la RIP di esercitare la propria azione citotossica su diversi bersagli cellulari. Infatti, oltre al *target* ribosomiale, la saporina potrebbe agire sul DNA esercitando l'attività PNAG e il danno al DNA potrebbe essere un meccanismo attraverso il quale la RIP innesca la morte cellulare, per esempio attivando l'apoptosi DNA-dipendente (Polito *et al.*, 2009).

**Gli studi sulla lanceolina e sulla stenodactilina** aiutano a spiegare l'elevata tossicità di queste due proteine e soprattutto della stenodactilina, rispetto alle altre RIP bicatinarie tossiche.

I primi dati, ottenuti valutando l'inibizione della sintesi proteica (sia nel sistema *cell-free* che cellulare) hanno subito evidenziato la maggiore tossicità della stenodactilina rispetto alla lanceolina. Oltre all'elevata

capacità delle due RIP nell'inibire la sintesi proteica cellulare, è stato anche osservato il coinvolgimento della morte cellulare apoptotica. L'elevata tossicità della lanceolina e della stenodactilina potrebbe, quindi, dipendere non solo dall'inibizione delle sintesi proteiche causata dalle due tossine, ma anche dalla loro capacità di indurre apoptosi. Infatti, i due processi citotossici potrebbero agire in maniera sinergica per provocare la morte delle cellule trattate. Quale sia il meccanismo iniziale che provoca l'innescio della morte cellulare rimane ancora da chiarire.

Le differenze di citotossicità tra la stenodactilina e altre RIP analizzate sono molto accentuate. Infatti, la stenodactilina ha un valore di  $IC_{50}$  sulle cellule HeLa di  $1.9 \times 10^{-14}$  M, due ordini di grandezza in meno rispetto alla lanceolina e ben quattro ordini di grandezza in meno rispetto alla ricina (dalla rassegna Barbieri *et al.*, 1993), una delle RIP bicatenarie più tossiche. Tuttavia, il *routing* intracellulare tracciato per la lanceolina e la stenodactilina, non ha grosse differenze rispetto a quanto noto per la ricina. Anche la lanceolina e la stenodactilina hanno tra le loro tappe intracellulari l'apparato del Golgi, fondamentale per l'approdo al RER, e per il blocco della sintesi proteica. Mediante valutazione della quantità di lanceolina e stenodactilina associata alla membrana ed intracellulare, è stato osservato che in entrambi i casi il valore rilevato per la stenodactilina è maggiore rispetto a quanto riscontrato per la lanceolina e per le altre RIP bicatenarie saggiate in precedenza nel nostro laboratorio (Battelli *et al.*, 2004). Inoltre, è stato anche dimostrato che una certa percentuale di lanceolina e stenodactilina, viene esocitata integra dalle cellule e può essere nuovamente internalizzata. La stenodactilina, rispetto alle altre RIP ha mostrato un buon livello di accumulo intracellulare, dovuto ad una maggiore velocità del *turnover* dei recettori cellulari e un'elevata efficienza di legame.

Concludendo, la maggiore citotossicità della stenodactilina rispetto alle altre RIP bicatenarie tossiche, sembra risiedere soprattutto nella bassa degradazione cellulare e nella velocità di *turnover*, che gli consentirebbe di

essere rapidamente riciclata e internalizzata da altre cellule, che ne vengono intossicate.

# Capitolo 7

-

## Bibliografia

- Allen EH, Schweet RS. Synthesis of hemoglobin in a cell-free system. I. Properties of the complete system. *J Biol Chem.* 1962; 237:760-7.
- Bálint GA. Ricin: the toxic protein of castor oil seeds. *Toxicology.* 1974; 2:77-102.
- Baluna R, Coleman E, Jones C, Ghetie V, Vitetta ES. The effect of a monoclonal antibody coupled to ricin A chain-derived peptides on endothelial cells in vitro: insights into toxin-mediated vascular damage. *Exp Cell Res.* 2000; 258(2):417-424.
- Barbieri L, Gasperi-Campani A, Derenzini M, Betts CM, Stirpe F. Selective lesions of acinar pancreatic cells in rats poisoned with abrin. A morphological and biochemical study. *Virchows Arch. B Cell Path.* 1979; 30:15-24
- Barbieri L and Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants: Properties and possible uses. *Cancer Surveys.* 1982-a; 1(3): 489-520.
- Barbieri L, Aron GM, Irvin JD, Stirpe F. Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the seeds of *Phytolacca americana* L. (pokeweed). *Biochem J.* 1982-b; 203(1):55-59.
- Barbieri L, Falasca A, Franceschi C, Licastro F, Rossi CA, Stirpe F. Purification and properties of two lectins from the latex of the euphorbiaceous plants *Hura crepitans* L. (sand-box tree) and *Euphorbia characias* L. (Mediterranean spurge). *Biochem. J.* 1983; 215:433-439.
- Barbieri L, Bolognesi A, Cenini P, Falasca AI, Minghetti A, Garofano L, Guicciardi A, Lappi D, Miller SP, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plant cells in culture. *Biochem J.* 1989; 257(3):801-807.
- Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1154(3-4):237-282. Review.
- Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, Castiglioni P, Stirpe F. Unexpected activity of saporins. *Nature.* 1994; 372(6507):624.
- Barbieri L, Valbonesi P, Gorini P, Pession A, Stirpe F. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on DNA, RNA and poly(A). *Biochem J.* 1996; 319:507-513.
- Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F. Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(3):518-522.
- Barbieri L, Bolognesi A, Valbonesi P, Polito L, Olivieri F, Stirpe F. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of immunotoxins containing ribosome-inactivating proteins. *J Drug Target.* 2000; 8(5):281-288.



- Barbieri L, Brigotti M, Perocco P, Carnicelli D, Ciani M, Mercatali L, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins depurinate poly(ADP-ribosyl)ated poly(ADP-ribose) polymerase and have transforming activity for 3T3 fibroblasts. *FEBS Lett.* 2003; 538(1-3):178-182.
- Bass HW, Webster C, OBrian GR, Roberts JKM, Boston, R.S. A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2. *Plant Cell.* 1992; 4:225-234.
- Battelli MG, Lorenzoni E, Stirpe F, Cella R, Parisi B. Differential effect of ribosome-inactivating proteins on plant ribosomes activity and plant cells growth. *J. Exp. Bot.* 1984; 155:882-889.
- Battelli MG, Barbieri L, Stirpe F. Toxicity of, and histological lesions caused by, ribosome-inactivating proteins, their IgG-conjugates, and their homopolymers. *APMIS.* 1990; 98(7):585-593.
- Battelli MG, Montacuti V, Stirpe F. High sensitivity of cultured human trophoblasts to ribosome-inactivating proteins. *Exp Cell Res.* 1992; 201(1):109-112.
- Battelli MG, Buonamici L, Bolognesi A, Stirpe F. In vivo and in vitro uptake of an anti-CD30/saporin immunotoxin by rat liver parenchymal and nonparenchymal cells. *Hepatology.* 1994; 20(4 Pt 1):940-7.
- Battelli MG, Citores L, Buonamici L, Ferreras JM, de Benito FM, Stirpe F, Girbes T. Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: comparison with ricin. *Arch Toxicol.* 1997; 71(6):360-364.
- Battelli MG, Musiani S, Monti B, Buonamici L, Sparapani M, Contestabile A, Stirpe F. Ricin toxicity to microglial and monocytic cells. *Neurochem Int.* 2001; 39(2):83-93.
- Battelli MG, Musiani S, Buonamici L, Santi S, Riccio M, Maraldi NM, Girbes T, Stirpe F. Interaction of volkensin with HeLa cells: binding, uptake, intracellular localization, degradation and exocytosis. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(15):1975-1984.
- Benigni F, Canevari S, Gadina M, Adobati E, Ferreri AJ, Di Celle EF, Comolli R, Colnaghi MI. Preclinical evaluation of the ribosome-inactivating proteins PAP-1, PAP-S and RTA in mice. *Int J Immunopharmacol.* 1995; 17(10):829-839.
- Blakey DC, and Thorpe PE. Effect of chemical deglycosylation on the in vivo fate of ricin A-chain. *Cancer Drug Deliv.* 1986; 3:189-196
- Blakey DC, Watson GJ, Knowles PP, and Thorpe PE. Effect of chemical deglycosylation of ricin A chain on the in vivo fate and cytotoxic activity of an immunotoxin composed of ricin A chain and anti-Thy 1.1 antibody. *Cancer Res.* 1987; 47:947-952.

- Bolognesi A, Tazzari PL, Tassi C, Gromo G, Gobbi M, Stirpe F. A comparison of anti-lymphocyte immunotoxins containing different ribosome-inactivating proteins and antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1992; 89(3):341-346.
- Bolognesi A, Tazzari PL, Olivieri F, Polito L, Falini B, Stirpe F. Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins. *Int J Cancer.* 1996; 68(3):349-355.
- Bolognesi A, Polito L, Olivieri F, Valbonesi P, Barbieri L, Battelli MG, Carusi MV, Benvenuto E, Del Vecchio Blanco F, Di Maro A, Parente A, Di Loreto M and Stirpe F. New ribosome-inactivating proteins with polynucleotide:adenosine glycosidase and antiviral activities from *Basella rubra* L. and *Bougainvillea spectabilis* Willd. *Planta.* 1997; 203:422-429.
- Bolognesi A, Tazzari PL, Olivieri F, Polito L, Lemoli R, Terenzi A, Pasqualucci L, Falini B, Stirpe F. Evaluation of immunotoxins containing single-chain ribosome inactivating proteins and an anti-CD22 monoclonal antibody (OM124): in vitro and in vivo studies. *Br. J. Haematol.* 1998; 101:179-188.
- Bolognesi A, Polito L, Farini V, Bortolotti M, Tazzari PL, Ratta M, Ravaioli A, Horenstein AL, Stirpe F, Battelli MG, Malavasi F. CD38 as a target of IB4 mAb carrying saporin-S6: design of an immunotoxin for ex vivo depletion of hematological CD38+ neoplasia. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2005; 19(3-4):145-152.
- Bouldin TW, Earnhardt TS, Goines ND. Sequential changes in the permeability of blood-nerve barriere over the course of ricin neuropathy in the rat. *Neurotoxicol.* 1990; 11:23-34.
- Brandner MD, Bunke HJ, Campagna-Pinto D. Experimental treatment of neuromas in the rat by retrograde axoplasmic transport of ricin with selective destruction of ganglion cells. *J. Hand Surg. Am.* 1989; 14:710-714.
- Brigotti M, Carnicelli D, Alvergnà P, Mazzaracchio R, Sperti S, Montanaro L. The RNA-N-glycosidase activity of Shiga-like toxin I: kinetic parameters of the native and activated toxin. *Toxicon.* 1997; 35(9):1431-1437.
- Brigotti M, Alfieri R, Sestili P, Bonelli M, Petronini PG, Guidarelli A, Barbieri L, Stirpe F, Sperti S. Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB J.* 2002; 16(3):365-372.
- Brust J, Filipp G, Hofmann U, Kalies I, Rajke K, Steiz RKM, Trommer WE. Antigen gelonin-conjugates. Preparation and application in experimental myasthenia gravis. *Boil. Chem. Hoppe-Seyler.* 1987; 368:991-999.
- Bussing A, Suzart K, Bergmann J, Pfuller U, Schietzel M, Schweizer K. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett.* 1996; 99(1):59-72.
- Bussing A, Multani AS, Pathak S, Pfuller U, Schietzel M. Induction of apoptosis by the N-acetyl-galactosamine-specific toxic lectin from *Viscum album* L. is associated with

- a decrease of nuclear p53 and Bcl-2 proteins and induction of telomeric associations. *Cancer Lett.* 1998; 130(1-2):57-68.
- Butterworth AG, Lord JM. Ricin and Ricinus communis agglutinin are all derived from a single-size polypeptide precursor. *Eur. J. Biochem.* 1983; 137:57-65.
- Byers VS, Baldwin RW. Therapeutic strategies with monoclonal antibodies and immunoconjugates. *Immunology.* 1988; 65(3):329-335. Review.
- Byers VS, Levin AS, Waites LA, Starrett BA, Mayer RA, Clegg JA, Price MR, Robins RA, Delaney M, Baldwin RW. A phase I/II study of trichosanthin treatment of HIV disease. *AIDS.* 1990; 4(12):1189-1196.
- Byers VS, Levin AS, Malvino A, Waites L, Robins RA, Baldwin RW. A phase II study of effect of addition of trichosanthin to zidovudine in patients with HIV disease and failing antiretroviral agents. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994; 10(4):413-420.
- Campos EC, Schiavi C, Bolognesi A, Bellusci C, Lubelli C, Duca A, Polito L, Poulas K, Tzartos SJ, Stirpe F. Selective lesions of rabbit extraocular muscles injected with the anti-AChR immunotoxin saporin-mAb 73. *Curr Eye Res.* 2002; 24(1):58-65.
- Cavallaro U, del Vecchio A, Lappi DA, Soria MR. A conjugate between human urokinase and saporin, a type-1 ribosome-inactivating protein, is selectively cytotoxic to urokinase receptor-expressing cells. *J Biol Chem.* 1993; 268(31):23186-23190.
- Chaddock J, Roberts LM. Mutagenesis and kinetic analysis of the active site Glu177 of ricin A-chain. *Protein Eng.* 1993; 6:425-431.
- Chaddock JA, Monzingo AF, Robertus JD, Lord JM, Roberts LM. Major structural differences between pokeweed antiviral protein and ricin A-chain do not account for their differing ribosome specificity. *Eur J Biochem.* 1996; 235(1-2):159-166.
- Chambery A, Di Maro A, Monti MM, Stirpe F, Parente A. Volkensin from *Adenia volkensii* Harms (kilyambiti plant), a type 2 ribosome-inactivating protein. *Eur J Biochem.* 2004; 271(1):108-117.
- Chaudhry B, Muller-Uri F, Cameron-Mills V, Gough S, Simpson D, Skriver K, Mundy J. The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant J.* 1994; 6(6):815-824.
- Chen A, Hu T, Mikoryak C, Draper RK. Retrograde transport of protein toxins under conditions of COPI dysfunction. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1589(2):124-139.
- Chow LP, Chang KH, Lin JY. Selective cytotoxic effects of immunotoxin--monoclonal anti-AFP-abrin-A chain conjugate on several human hepatoma cell lines. *Biochem Int.* 1990; 22(1):95-102.

- Contestabile A, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants as agents for suicide transport and immunolesioning in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 1993; 5:1292-1301. Review.
- Christiansen SP, Sandnas A, Prill R, Youle RJ, McLoon LK. Acute effects of the skeletal muscle-specific immunotoxin ricin-mAb 35 on extraocular muscles of rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(11):3402-3409.
- Christiansen SP, Peterson D, To T, Youle R, McLoon L. Long-term effects of ricin-mAb 35 on extraocular muscles of rabbits: potential treatment for strabismus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43(3):679-685.
- Christiansen SP, Becker BA, Iaizzo PA, McLoon LK. Extraocular muscle force generation after ricin-mAb35 injection: implications for strabismus treatment. *J AAPOS.* 2003; 7(1):1-6.
- Damke H. Dynamin and receptor-mediated endocytosis. *FEBS Lett.* 1996; 389(1):48-51. Review.
- Descotes G, Romano M, Stirpe F, Spreafico F. The immunological activity of plant toxins used in the preparation of immunotoxins--II. The immunodepressive activity of gelonin. *Int J Immunopharmacol.* 1985; 7(4):455-463.
- Derenzini M, Bonetti E, Marinozzi V, Stirpe F. Toxic effects of ricin. Studies on the pathogenesis of the liver lesions. *Virchows Arch. B Cell Path.* 1976; 20:15-28.
- Dixon T. *Austral. Med. Gazette.* 1887; 6:137-155.
- de Benito FM, Citores L, Iglesias R, Ferreras JM, Soriano F, Arias J, Méndez E, Gírbés T. Ebulitins: a new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNA N-glycosidases) from leaves of *Sambucus ebulus* L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin 1. *FEBS Lett.* 1995; 360(3):299-302.
- de Benito FM, Iglesias R, Ferreras JM, Citores L, Camafeita E, Méndez E, Gírbés T. Constitutive and inducible type 1 ribosome-inactivating proteins (RIPs) in elderberry (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Lett.* 1998; 428(1-2):75-79.
- Di Maro A, Valbonesi P, Bolognesi A, Stirpe F, De Luca P, Siniscalco Gigliano G, Gaudio L, Delli Bovi P, Ferranti P, Malorni A, Parente A. Isolation and characterization of four type-1 ribosome-inactivating proteins, with polynucleotide:adenosine glycosidase activity, from leaves of *Phytolacca dioica* L. *Planta.* 1999; 208(1):125-131.
- Ehrlich P. Ueber ricin. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1981; 32:976-979.
- Eiklid K, Olsnes S, Pihl A. Entry of lethal dose of abrin, ricin, and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 1980; 126:321-326.

- Embleton MJ, Charleston A, Robins RA, Pimm MV, Baldwin RW. Recombinant ricin toxin A chain cytotoxicity against carcinoembryonic antigen expressing tumour cells mediated by a bispecific monoclonal antibody and its potentiation by ricin toxin B chain. *Br. J. Cancer*. 1991; 63:670-674
- Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem*. 1987; 262(12):5908-5912.
- Endo Y, Tsurugi K. The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. *J Biol Chem*. 1988; 263(18):8735-8739.
- Endo Y, Gluck A, Wool IG. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J. Mol. Biol*. 1991; 254:848-855.
- Falini B, Bolognesi A, Flenghi L, Tazzari PL, Broe MK, Stein H, Dürkop H, Aversa F, Corneli P, Pizzolo G, et al. Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin. *Lancet*. 1992; 339(8803):1195-1196.
- Ferreras JM, Barbieri L, Girbes T, Battelli MG, Rojo MA, Arias FJ, Rocher MA, Soriano F, Mendez E, Stirpe F. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1216(1):31-42.
- Fodstad O, Olsnes S, Pihl A. Inhibitory effect of abrin and ricin on the growth of transplantable murine tumors and of abrin on human cancers in nude mice. *Cancer Res*. 1977; 37(12):4559-4567.
- Foxwell BM, Donovan TA, Thorpe PE, Wilson G. The removal of carbohydrates from ricin with endoglycosidases H, F and D and alpha-mannosidase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1985; 840:193-203.
- Foxwell BM, Blakey DC, Brown AN, Donovan TA, Thorpe PE. The preparation of deglycosylated ricin by recombination of glycosidase-treated A- and B-chains: effects of deglycosylation on toxicity and in vivo distribution. *Biochim. Biophys. Acta*. 1987; 923:59-65.
- Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA. Targeted toxins. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(2):326-34. Review.
- Fraker PJ, Speck JC Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978;80(4):849-57.

- Fujii J, Matsui T, Heatherly DP, Schlegel KH, Lobo PI, Yutsudo T, Ciraolo GM, Morris RE, Obrig T. Rapid apoptosis induced by Shiga toxin in HeLa cells. *Infect Immun.* 2003; 71(5):2724-2735.
- Gan YH, Peng SQ, Liu HY. Molecular mechanism of apoptotic induced by ricin in HeLa cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 2001; 21:243-248.
- Garcia PA, Bredesen DE, Vinters HV, Graefin von Einsiedel R, Williams RL, Kahn JO, Byers VS, Levin AS, Waites LA, Messing RO. Neurological reactions in HIV-infected patients treated with trichosanthin. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1993; 19(5):402-405.
- Ghetie MA, Richardson J, Tucker T, Jones D, Uhr JW, Vitetta ES. Disseminated or localized growth of a human B-cell tumor (Daudi) in SCID mice. *Int. J. Cancer.* 1990; 45:481-485.
- Ghetie V, Thorpe P, Ghetie MA, Knowles P, Uhr JW, Vitetta ES. The GLP large scale preparation of immunotoxins containing deglycosylated ricin A chain and a hindered disulfide bond. *J Immunol Methods.* 1991-a; 142(2):223-230.
- Ghetie MA, Uhr JW, Vitetta ES. Covalent binding of human  $\alpha$ 2-macroglobulin to deglycosylated ricin A chain and its immunotoxins. *Cancer Res.* 1991-b; 51:1482-1487.
- Ghetie V, Engert A, Schnell R and Vitetta ES. The in vivo anti-tumor activity of immunotoxins containing two versus one deglycosylated ricin A chains. *Cancer Lett.* 1995; 98:97-101.
- Goldmacher VS, Bourret LA, Levine BA, Rasmussen RA, Pourshadi M, Lambert JM, Anderson KC. Anti-CD38-blocked ricin: an immunotoxin for the treatment of multiple myeloma. *Blood.* 1994; 84:3017-3025.
- Gonatas NK, Gonatas JO, Stieber A. The involvement of the Golgi apparatus in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, and ricin intoxication. *Histochem. Cell. Biol.* 1998;109(5-6):591-600. Review.
- Goto LS, Castilho PV, Cominetti MR, Selistre-Araújo HS, Ulian Araújo AP. Endocytosis of pulchellin and its recombinant B-chain into K-562 cells: binding and uptake studies. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1770(12):1660-1666.
- Griffiths GD, Leek MD, Gee DJ. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. *J. Pathol.* 1987; 151:221-229.
- Griffiths GD, Lindsay CD, Allenby AC, Bailey SC, Scawin JW, Rice P, Upshall DG. Protection against inhalation toxicity of ricin and abrin by immunisation. *Hum Exp Toxicol.* 1995; 14(2):155-64.

- Hao Q, Van Damme EJM, Hause B, Barre A, Chen Y, Roug  P, Peumans WJ. Iris (Iris hollandica var Professor Blaauw) bulbs express type-1 and type-2 ribosomeinactivating proteins with unusual properties. *Plant. Physiol.* 2001; 125:866-876.
- Harper CG, Gonatas JO, Mizutani T, Gonatas NK. Retrograde transport and effects of toxic ricin in the autonomic nervous system. *Lab. Invest.* 1980; 42:396-404.
- Hartley MR, Chddock JA, Bonnes MS. The structure and function of ribosomeinactivating proteins. *Trend Plant Sci.* 1996; 1:254-260.
- Harrison AR, Skladzien S, Christiansen SP, McLoon LK. Myotoxic effects of the skeletal muscle-specific immunotoxin, ricin-mAb35, on orbicularis oculi muscle after eyelid injections in rabbits. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2004; 20(4):312-316.
- Hasegawa N, Kimura Y, Oda T, Komatsu N, Muramatsu T. Isolated ricin B-chain-mediated apoptosis in U937 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 64(7):1422-1429.
- Hatakeyama T, Yamasaki N, Funatsu G. Identification of the tryptophan residue located at the low affinity saccaride binding site of ricin D. *J. Biochem.* 1986; 100:781-788.
- Henry MA, Westrum LE, Jhonson RL, Canfield RC. Ultrastructure of degenerative changes following ricin application to feline dental pulps. *J. Neurocytol.* 1987; 16:601-611
- Hewetson JF, Rivera VR, Creasia DA, Lemley PV, Rippey MK, Poli MA. Protection of mice from inhaled ricin by vaccination with ricin or by passive treatment with heterologous antibody. *Vaccine.* 1993; 11(7):743-746.
- Holleman HJ, Bertina RM. Scatchard plot and heterogeneity in binding affinity of labeled and unlabeled ligand. *Clin Chem.* 1975; 21(12):1769-1773.
- Holm PK, Eker P, Sandvig K, van Deurs B. Phorbol myristate acetate selectively stimulates apical endocytosis via protein kinase C in polarized MDCK cells. *Exp Cell Res.* 1995; 217(1):157-168.
- Hong Y, Saunders K, Harley M R, Stanley J. Resistance to geminivirus infection by virus induced expression of dianthin in transgenic plants. *Virology.* 1996; 220:119-127.
- Horisberger M. Colloidal gold: a cytochemical marker for light and fluorescent microscopy and for transmission and scanning electron microscopy. *Scan Electron Microsc.* 1981; (Pt 2):9-31.
- Hott JS, Dalakas MC, Sung C, Hallett M, Youle RJ. Skeletal muscle-specific immunotoxin for the treatment of focal muscle spasm. *Neurology.* 1998; 50(2):485-491

- Hu R, Zhai Q, Liu W, Liu X. An insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell: roles of Bcl-2 family proteins, caspases, Ca(2+)-dependent proteases and protein kinase C. *J Cell Biochem.* 2001; 81(4):583-593.
- Hudak KA, Dinman JD, Tumer NE. Pokeweed antiviral protein accesses ribosomes by binding to L3. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:3859-3864.
- Hudak KA, Wang P, Tumer NE. A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template. *RNA.* 2000; 6:369-380.
- Hughes JN, Lindsay CD, Griffiths GD. Morphology of ricin and abrin exposed endothelial cells is consistent with apoptotic cell death. *Hum Exp Toxicol.* 1996; 15(5):443-451.
- Ippoliti R, Ginobbi P, Lendaro E, D'Agostino I, Ombres D, Benedetti PA, Brunori M, Citro G. The effect of monensin and chloroquine on the endocytosis and toxicity of chimeric toxins. *Cell Mol Life Sci.* 1998; 54(8):866-875.
- Iversen TG, Skretting G, Llorente A, Nicoziani P, van Deurs B, Sandvig K. Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9-and Rab11-GTPases. *Mol Biol Cell.* 2001; 12(7):2099-2107.
- Jackman MR, Ellis JA, Gray SR, Shurety W, Luzio JP. Cell polarization is required for ricin sensitivity in a Caco-2 cell line selected for ricin resistance. *Biochem J.* 1999; 341:323-327.
- Jansen FK, Bourrie B, Casellas P, Dussossoy D, Gros O, Vic P, Vidal H, Gros P. Toxin selection and modification: utilization of the A chain of ricin. In: *Immunotoxins (A.E. Frankel, ed.) Kluwer Academic Publishers, Boston.* 1988; Pp 97-111. Review.
- Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D. In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneimittelforschung.* 1993; 43(11):1221-1227.
- Jones NL, Islur A, Haq R, Mascarenhas M, Karmali MA, Perdue MH, Zanke BW, Sherman PM. Escherichia coli Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 278(5):G811-9.
- Kahn JO, Kaplan LD, Gambertoglio JG, Bredesen D, Arri CJ, Turin L, Kibort T, Williams RL, Lifson JD, Volberding PA. The safety and pharmacokinetics of GLQ223 in subjects with AIDS and AIDS-related complex: a phase I study. *AIDS.* 1990; 4(12):1197-1204.
- Kaku H, Tanaka Y, Tazaki K, Minami E, Mizuno H, and Shibuya N. Sialylated oligosaccharide-specific plant lectin from Japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*) bark tissue has a homologous structure to type II ribosome-inactivating proteins, ricin and abrin. cDNA cloning and molecular modeling study. *NJ. Biol. Chem.* 1996; 271:1480-1485.



- Katzin BJ, Collins EJ, Robertus JD. Structure of Ricin A-chain at 2.5 Å. *Proteins*. 1991; 10:251-259.
- Kende M, Yan C, Hewetson J, Frick MA, Rill WL, Tammariello R. Oral immunization of mice with ricin toxoid vaccine encapsulated in polymeric microspheres against aerosol challenge. *Vaccine*. 2002; 20(11-12):1681-1691.
- Kim JK, Robertus JD. Analysis of several key active site residues of ricin A chain by mutagenesis an X-ray crystallography. *Protein Eng*. 1992; 5:775-779.
- Kimura Y, Hase S, Kobayashi Y, Kyogoku Y, Ikenaka T, Funatsu G. Structure of sugar chains of ricin D. *J. Biochem*. 1988; 103:944-949.
- Knechtle SJ. Treatment with immunotoxin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356(1409):681-689. Review.
- Kochi SK, Collier RJ. DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. *Exp. Cell Res*. 1993; 208(1):296-302.
- Kojio S, Zhang H, Ohmura M, Gondaira F, Kobayashi N, Yamamoto T. Caspase 3 activation and apoptosis induction coupled with the retrograde transport of Shiga toxin: inhibition by brefeldin A. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000; 29(4):275-281.
- Krauspenhaar R, Eschenburg S, Perbandt M, Kornilov V, Konareva N, Mikailova I. Stoeva, S., Wacker, R., Maier, T., Singh, T., Mikhailov, A., Voelter, W., Betzel, C. Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1999; 257:418-424.
- Krek CE, Ladino CA, Goldmacher VS, Blattler WA, Guild BC. Expression and secretion of a recombinant ricin immunotoxin from murine myeloma cells. *Protein Eng*. 1995; 8:481-489.
- Kubota S, Yeung HW, Yang JT. Conformation of abortifacient proteins trichosanthin, a-momorcharin and b-momorcharin. *Biochim. Biophys. Acta*. 1986; 871:101-106.
- Kurinov IV, Rajamohan F, Venkatachalam TK, Uckun FM. X-ray crystallographic analysis of the structural basis for the interaction of pokeweed antiviral protein with guanine residues of ribosomal RNA. *Protein Sci*. 1999; 8:2399-2405.
- Lambert JM, Blättler WA, McIntyre GD, Goldmacher VS, Scott CF. Immunotoxins containing single chain ribosome-inactivating proteins. In: *Immunotoxins* (A.E. Frankel, ed.) *Kluwer Academic Publishers*. 1988; Pp 175-209
- Langer M, Mockel B, Eck J, Zinke H, Lentzen H. Site-specific mutagenesis of mistletoe lectin: the role of RIP activity in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 264(3):944-948.

- Lehar SM, Pedersen JT, Kamat RS, Swimmer C, Goldmacher VS, Lambert JM, Blatter WA, Guild BC. Mutational and structural analysis of the lectin activity in binding domain 2 of ricin B chain. *Protein Eng.* 1994; 7:1261-1266.
- Lendaro E, Ippoliti R, Bellelli A, Brunori M, Evangelista V, Guidarini D, Benedetti PA. Intracellular dynamics of ricin followed by fluorescence microscopy on living cells reveals a rapid accumulation of the dimeric toxin in the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* 1994; 344(1):99-104.
- Lennon SV, Kilfeather SA, Cotter TG. The role of calcium in the induction of apoptosis in human tumour cell lines. *Biochem Soc Trans.* 1992; 20(1):77S.
- Li M, Chen Y, Liu Z, Shen F, Bian X, Meng Y. Anti-tumor activity and immunological modification of ribosome-inactivating protein (RIP) from *Momordica charantia* by covalent attachment of polyethylene glycol. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2009; 41(9):792-799.
- Licastro F, Morini MC, Bolognesi A, Stirpe F. Ricin induces the production of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\alpha$  by human peripheral-blood mononuclear cells. *Biochem. J.* 1993; 294:517-520.
- Lin JY, Tserng KY, Chen CC, Tung TC. Abrin and ricin: new anti-tumor substances. *Nature.* 1970; 227(5255):292-293.
- Lin JY, Cheng YC, Liu K, Tung TC. Carbohydrate in abrin. *Toxicon.* 1971; 9(4):353-360.
- Liu RS, Yang JH, Liu WY. Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A). *Eur J Biochem.* 2002; 269(19):4746-4752.
- Llorente A, van Deurs B, Garred O, Eker P, Sandvig K. Apical endocytosis of ricin in MDCK cells is regulated by the cyclooxygenase pathway. *J Cell Sci.* 2000; 113:1213-1221.
- Lord JM, Roberts LM, Robertus JD. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* 1994; 8(2):201-218. Review.
- Lu P, Jin Y. Ectopic pregnancy treated with trichosanthin. *Chin. Med. J.* 1989; 102:365-367.
- Lubelli C, Chatgililoglu A, Bolognesi A, Strocchi P, Colombatti M, Stirpe F. Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immuno-polymerase chain reaction assay. *Anal Biochem.* 2006; 355(1):102-109.
- Madan S, Ghosh PC. Enhancing potency of liposomal monensin on ricin cytotoxicity in mouse macrophage tumor cells. *Biochem Int.* 1992; 28(2):287-295.

- Magnusson S, Kjekken R, Berg T. Characterization of two distinct pathways of endocytosis of ricin by rat liver endothelial cells. *Exp Cell Res.* 1993; 205(1):118-125.
- Mlsna D, Monzingo AF, Katzin BJ, Ernst S, Robertus JD. Structure of recombinant ricin A-chain at 2.3 Å. *Protein Sci.* 1993; 2:429-435.
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res.* 1992; 269(3):375-582.
- Montanaro L, Sperti S, Stirpe F. Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin. *Biochem J.* 1973; 136(3):677-683.
- Montfort W, Villafranca JE, Monzingo AF, Ernst S, Katzin B, Rutenber E, Xuong NH, Hamlin R, Robertus JD. Three-dimensional structure of ricin at 2.8Å. *Biol. Chem.* 1987; 262:5398-5403.
- Monti B, D'Alessandro C, Farini V, Bolognesi A, Polazzi E, Contestabile A, Stirpe F, Battelli MG. In vitro and in vivo toxicity of type 2 ribosome-inactivating proteins lanceolin and stenodactylin on glial and neuronal cells. *Neurotoxicology.* 2007; 28(3):637-644.
- Monzingo AF, Robertus JD. X-ray analysis of substrate analogues in the ricin A-chain active site. *J. Mol. Biol.* 1992; 227:1136-1145.
- Moolten FL, Cooperband SR. Selected destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibodies directed against antigens on the cells. *Science.* 1970; 169:68-70.
- Mundy J, Leah R, Boston R, Endo Y, Stirpe F. Genes encoding ribosome-inactivating proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1994; 12:60-62.
- Narayanan S, Surolia A, Karande AA. Ribosome-inactivating protein and apoptosis: abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jurkat cells. *Biochem J.* 2004; 377(Pt 1):233-240.
- Narayanan S, Surendranath K, Bora N, Surolia A, Karande AA. Ribosome inactivating proteins and apoptosis. *FEBS Lett.* 2005; 579(6):1324-1331. Review.
- Ng TB, Chan WY, Yeung HW. Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from Cucurbitaceae plants. *Gen Pharmacol.* 1992; 23(4):579-590.
- Nicolson GL. The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 1974; 39:89-190. Review.

- Olsnes S, Pihl A. Abrin, ricin and their associated agglutinins. *The Specificity of Animal, Bacterial and Plant Toxins*. (P. Cuatrecasas, ed.) Chapman and Hall, London. Pp. 1977; 129-173.
- Olsnes S, Sandvig K, Eiklid K, Pihl A. Properties and action mechanism of the toxic lectin modeccin: interaction with cell lines resistant to modeccin, abrin, and ricin. *J Supramol Struct*. 1978; 9(1):15-25.
- Olsnes S, Sandvig K. How protein toxins enter and kill cells. *Cancer Treat Res*. 1988; 37:39-73. Review.
- Olsnes S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*. 2004; 44(4):361-370. Review.
- Ouyang DY, Chan H, Wang YY, Huang H, Tam SC, Zheng YT. An inhibitor of c-Jun N-terminal kinases (CEP-11004) counteracts the anti-HIV-1 action of trichosanthin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 339(1):25-29.
- Pascal JM, Day PJ, Monzingo AF, Ernst SR, Robertus JD, Iglesias R, Perez Y, Ferreras JM, Citores L, Girbes T. 2.8-A crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin I. *Proteins*. 2001; 43(3):319-326.
- Paul I, Devor M. Completeness and selectivity of ricin "suicide transport" lesions in rat dorsal ganglia. *J. Neurosci. Meth*. 1987; 22:103-111.
- Pelosi E, Lubelli C, Polito L, Barbieri L, Bolognesi A, Stirpe F. Ribosome inactivating-proteins and other lectins from Adenia (Passifloraceae). *Toxicon*. 2005; 46(6):658-63.
- Peterson CM, Ejlersen E, Wendelboe-Harsen P, Gliemann J. Binding of  $\alpha_2$  macroglobulin-trypsin complex to human monocytes in culture. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. 1987; 47:55-61.
- Peumans WJ, Roy S, Barre A, Roug   P, Van Leuven F, Van Damme EJM. Elderberry (*Sambucus nigra*) contains truncated Neu5Ac( $\alpha$ -2,6)Gal/GalNAc-binding type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett*. 1998; 425:35-39.
- Peumans WJ, Hao Q, Van Damme EJ. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J*. 2001; 15(9):1493-1506. Review.
- Pincus SH, Cole RL, Hersh EM, Lake D, Masuho Y, Durda PJ, McClure J. In vitro efficacy of anti-HIV immunotoxins targeted by various antibodies to the envelope protein. *J. Immunol*. 1991; 12:4315-4324.
- Pincus SH, Tolstikov VV. Anti-human immunodeficiency virus immunoconjugates. *Adv Pharmacol*. 1995; 32:205-47. Review.

- Pincus SH, Wehrly K, Cole R, Fang H, Lewis GK, McClure J, Conley AJ, Wahren B, Posner MR, Notkins AL, Tilley SA, Pinter A, Eiden L, Teintze M, Dorward D, Tolstikov VV. In vitro effects of anti-HIV immunotoxins directed against multiple epitopes on HIV type 1 envelope glycoprotein 160. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1996; 12:1041-1051.
- Polito L, Bortolotti M, Farini V, Battelli MG, Barbieri L, Bolognesi A. Saporin induces multiple death pathways in lymphoma cells with different intensity and timing as compared to ricin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41(5):1055-1061.
- Poyet JL, Hoeveler A. cDNA cloning and expression of pokeweed antiviral protein from seeds in *Escherichia coli* and its inhibition of protein synthesis in vitro. *FEBS Lett*. 1997; 406(1-2):97-100.
- Rajamohan F, Venkatachalam TK, Irvin JD, Uckun FM. Pokeweed antiviral protein isoforms PAP-I, PAP-II, and PAP-III depurinate RNA of human immunodeficiency virus (HIV)-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 260(2):453-458.
- Ready MP, Adams RP, Robertus JD. Dodecandrin, a new ribosome-inhibiting protein from *Phytolacca dodecandra*. *Biochim Biophys Acta*. 1984; 791(3):314-319.
- Reinbothe S, Reinbothe C, Lehmann J, Becker W, Apel K, Parthier B. JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(15):7012-7016.
- Riccobono F, Fiani ML. Mannose receptor dependent uptake of ricin A1 and A2 chain by macrophages. *Carbohydr. Res*. 1996; 282:285-292.
- Rippmann JF, Michalowski CB, Nelson DE, Bohnert HJ. Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress. *Plant Mol Biol*. 1997; 35(6):701-9.
- Rutenber E, Robertus JD. Structure of Ricin B-chain at 2.5 Å. *Proteins*. 1991; 10:260-269.
- Rutenber E, Katzin BJ, Collins EJ, Mlsna D, Ready MP, Robertus JD. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins*. 1991; 10:240-250.
- Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. Kinetics of binding of the toxic lectins abrin and ricin to surface receptors of human cells. *J Biol Chem*. 1976; 251(13):3977-3984.
- Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. Binding, uptake and degradation of the toxic proteins abrin and ricin by toxin-resistant cell variation. *Eur. J. Biochem*. 1978; 82:13-23.
- Sandvig K, Olsnes S. Entry of the toxic proteins abrin, modeccin, ricin, and diphtheria toxin into cells. II. Effect of pH, metabolic inhibitors, and ionophores and evidence for toxin penetration from endocytotic vesicles. *J Biol Chem*. 1982-a; 257(13):7504-7513.

- Sandvig K, Olsnes S. Entry of the toxic proteins abrin, modeccin, ricin, and diphtheria toxin into cells. I. Requirement for calcium. *J Biol Chem.* 1982-b; 257(13):7495-7503.
- Sandvig K, Prydz K, Hansen H, van Deurs B. Ricin transport in Brefeldin A treated cells: correlation between Golgi structure and toxic effect. *J. Cell. Biol.* 1991; 115:553-562.
- Sandvig K, Prydz K, van Deurs B. Endocytotic uptake of ricin and Shiga toxin. In: *Endocytosis. From Cell Biology to Health, Disease, and Therapy.* (Courtney, P.J., ed.) Springer Verlag, New York. Pp 1992; 405-412.
- Sandvig K, Garred O, Holm PK, van-Deurs B. Endocytosis and intracellular transport of protein toxins. *Biochem. Soc-Trans.* 1993; 21:707-711. Review.
- Sandvig K, VanDeurs B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.* 1996; 76(4):949-966. Review.
- Sandvig K, VanDeurs B. Endocytosis and intracellular transport of ricin: recent discoveries. *FEBS Lett.* 1999; 452(1-2):67-70. Review.
- Sato MS, Poirier GG, Lindahl T. Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry.* 1994; 33(23):7099-7106.
- Shih SF, Wu YH, Hung CH, Yang HY, Lin JY. Abrin triggers cell death by inactivating a thiol-specific antioxidant protein. *J Biol Chem.* 2001; 276(24):21870-21877.
- Siena S, Bregni M, Formosa A, Martineau D, Lappi DA, Bonadonna G, Gianni AM. Evaluation of antihuman T lymphocyte saporin immunotoxins potentially useful in human transplantation. *Transplantation.* 1988; 46(5):747-753.
- Simpson JC, Roberts LM, Lord JM. Catalytic and cytotoxic activities of recombinant ricin A chain mutants with charged residues added at the carboxyl terminus. *Protein Expr Purif.* 1995; 6(5):665-670.
- Simpson JC, Smith DC, Roberts LM, Lord JM. Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin. *Exp Cell Res.* 1998; 239(2):293-300.
- Sikriwal D, Ghosh P, Batra JK. Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(12):2880-2888.
- Skilleter DN, Paine AJ, Stirpe F. A comparison of the accumulation of ricin by hepatic parenchymal and non-parenchymal cells and its inhibition of protein synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1981; 677(3-4):495-500.

- Soriano J, Stockert JC, Villanueva A, Cañete M. Cell uptake of Zn(II)-phthalocyanine-containing liposomes by clathrin-mediated endocytosis. *Histochem Cell Biol.* 2010.
- Sperti S, Montanaro L, Mattioli A, Stirpe F. Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro: 60 S ribosomal subunit as the target of the toxin. *Biochem J.* 1973; 136(3):813-815.
- Sperti S, Montanaro L, Mattioli A, Testoni G, Stirpe F. Inhibition of protein synthesis in vitro by crotins and ricin. Effect on the steps of peptide chain elongation. *Biochem J.* 1976; 156(1):7-13.
- Sperti S, Montanaro L. Ricin and modeccin do not inhibit the elongation factor 1-dependent binding of aminoacyl-tRNA to ribosomes. *Biochem J.* 1979;178(1):233-236.
- Spooner RA, Hart PJ, Cook JP, Pietroni P, Rogon C, Höhfeld J, Roberts LM, Lord JM. Cytosolic chaperones influence the fate of a toxin dislocated from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(45):17408-17413.
- Spreadico F, Malfiore C, Moras ML, Marmonti L, Filippeschi S, Barbieri L, Perocco P, Stirpe F. The immunomodulatory activity of the plant proteins Momordica charantia inhibitor and pokeweed antiviral protein. *Int J Immunopharmacol.* 1983; 5(4):335-343.
- Stillmark H. Über ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L, und anderen Euphorbiaceen. *Inaug. Dissert., Dorpat, Estonia.* 1888.
- Stirpe F, Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. Action of viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:13271-13277
- Stirpe F. On the action of ribosome-inactivating proteins: are plant ribosomes species-specific? *Biochem J.* 1982; 202:279-80.
- Stirpe F, Gasperi-Campani A, Barbieri L, Falasca A, Abbondanza A and Stevens WA. Ribosome-inactivating proteins from the seeds of Saponaria officinalis L. (soapwort), of Agrostemma githago L. (corn cockle) and of Asparagus officinalis L. (asparagus) and from the latex of Hura crepitans L. (sandbox tree). *Biochem. J.*, 1983; 240:659-665.
- Stirpe F, Gasperi-Campani A, Barbieri L, Falasca A, Abbondanza A, Stevens WA. Ribosome-inactivating proteins from the seeds of Saponaria officinalis L. (soapwort), of Agrostemma githago L. (corn cockle) and of Asparagus officinalis L. (asparagus), and from the latex of Hura crepitans L. (sandbox tree). *Biochem J.* 1983; 216(3):617-625.
- Stirpe F, Barbieri L, Abbondanza A, Falasca AI, Brown AN, Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. Properties of volkensin, a toxic lectin from Adenia volkensii. *J Biol Chem.* 1985; 260(27):14589-14595.

- Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Falasca AI, Abbondanza A, Lorenzoni E, Stevens WA. Bryodin, a ribosome-inactivating protein from the roots of *Bryonia dioica* L. (white bryony). *Biochem J.* 1986; 240(3):659-665.
- Stirpe F, Bailey S, Miller SP, Bodley JW. Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(4):1349-1357.
- Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology (N Y).* 1992; 10(4):405-412. Review.
- Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon.* 2004 Sep 15;44(4):371-83. Review.
- Stirpe F, Battelli MG. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63(16):1850-1866. Review.
- Stirpe F, Bolognesi A, Bortolotti M, Farini V, Lubelli C, Pelosi E, Polito L, Dozza B, Strocchi P, Chambery A, Parente A, Barbieri L. Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla*(Passifloraceae). *Toxicon.* 2007; 50(1):94-105.
- Streit WJ, Kreutzberg GW. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J. Comp. Neurol.* 1988; 268:248-263.
- Strocchi P, Barbieri L, Stirpe F. Immunological properties of ribosome inactivating proteins and a saporin immunotoxin. *J Immunol Methods.* 1992; 155(1):57-63.
- Sweeney EC, Tonevitsky AG, Temiakov DE, Agapov II, Saward S, Palmer RA. Preliminary crystallographic characterization of ricin agglutinin. *Proteins.* 1997; 28(4):586-589.
- Tahirov TH, Lu TH, Liaw YC, Chen YL, Lin JY. Crystal structure of abin-a at 2.14 Å. *J. Mol. Biol.* 1995; 250:354-367.
- Tagge EP, Chandler J, Harris B, Czako M, Marton L, Willingham MC, Burbage C, Afrin L, Frankel AE. Preproricin expressed in *Nicotiana tabacum* cells in vitro is fully processed and biologically active. *Protein Expr. Purif.* 1996; 8:109-118.
- Tazzari PL, Barbieri L, Gobbi M, Dinota A, Rizzi S, Bontadini A, Pession A, Tura S, Stirpe F. An immunotoxin containing a rat-Ig M monoclonal antibody (Campath-1) and saporin 6: effect on T-lymphocytes and hemopoietic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 1988; 26:231-236.
- Tazzari PL, Bolognesi A, de Toter D, Pileri S, Conte R, Wijdenes J, Hervé P, Soria M, Stirpe F, Gobbi M. B-B10 (anti-CD25)-saporin immunotoxin - A possible tool in graft-versus-host disease treatment. *Transplantation.* 1992; 54:351-356.



- Thorpe PE, Ross WCJ. The preparation and cytotoxic properties of antibody-toxin coniugates. *Immunol. Rev.* 1982; 62:119-157. Review.
- Thorpe SC, Murdoch RD, Kemeny DM. The effect of the castor bean toxin, ricin, on rat IgE and IgG responses. *Immunology.* 1989; 68(3):307-311.
- Vago R, Marsden CJ, Lord JM, Ippoliti R, Flavell DJ, Flavell SU, Ceriotti A, Fabbrini MS. Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells. *FEBS J.* 2005; 272(19):4983-4995.
- Vallera DA, Kuroki DW, Panoskaltsis-Mortari A, Buchsbaum DJ, Rogers BE, Blazar BR. Molecular modification of a recombinant anti-CD3epsilon-directed immunotoxin by inducing terminal cysteine bridging enhances anti-GVHD efficacy and reduces organ toxicity in a lethal murine model. *Blood.* 2000; 96(3):1157-1165.
- Van Damme EJM, Barre A, Roug  P, Van Leuven F, and Peumans WJ. The NeuAc(alpha-2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. *Eur. J. Biochem.* 1996; 235:128-137.
- Van Damme EJM, Barre A, Roug  P, Van Leuven F, Peumans WJ. Characterization and molecular cloning of *Sambucus nigra* agglutinin V (nigrin b), a GalNAcspecific type-2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (*Sambucus nigra*). *Eur. J. Biochem.* 1996; 237:505-513.
- Van Damme EJM, Barre A, Rouge P, Van Leuven F, Peumans WJ. Isolation and molecular cloning of a novel type 2 ribosome-inactivating protein with an inactive B chain from elderberry (*Sambucus nigra*) bark. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:8353-8360.
- Van Damme EJM, Barre A, Barbieri L, Valbonesi P, Roug  P, Van Leuven F, Stirpe F, Peumans WJ. Type I ribosome-inactivating protein are the most abundant proteins in iris (*Iris hollandica* var. Professor Blaauw) bulbs: characterization and molecular cloning. *Biochem. J.* 1997; 324:963-970.
- Van Damme EJM, Hao Q, Chen Y, Barre A, Vandenbussche F, Desmyter S, Roug  P, Peumans WJ. Ribosome-inactivating proteins: a family of plat proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit.Rev.Plant Sci.* 2001; 20:395-465.
- van Deurs B, T nnessen TI, Petersen OW, Sandvig K, Olsnes S. Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex. *J Cell Biol.* 1986; 102(1):37-47.
- van Deurs B, Sandvig K, Petersen OW, Olsnes S, Simons K, Griffiths G. Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network. *J Cell Biol.* 1988; 106(2):253-267.

- Van Huyen JP, Bayry J, Delignat S, Gaston AT, Michel O, Bruneval P, Kazatchkine MD, Nicoletti A, Kaveri SV. Induction of apoptosis of endothelial cells by Viscum album: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Mol Med*. 2002; 8(10):600-606.
- Vervecken W, Kleff S, Pfüller U, Bussing A. Induction of apoptosis by mistletoe lectin I and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A- and B-chains. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000; 32(3):317-326.
- Vitetta ES, Thorpe PE. Immunotoxins containing ricin or its A chain. *Semin Cell Biol*. 1991; 2(1):47-58. Review.
- Vivanco JM, Savary BJ, Flores HE. Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the andean crop *Mirabilis expansa*. *Plant Physiol*. 1999; 119(4):1447-1456.
- Vooijs WC, Schuurman HJ, Bast EJ, de Gast GC. Evaluation of CD38 as target for immunotherapy in multiple myeloma. *Blood*. 1995; 85:2282-2284.
- Walsh TA, Morgan AE, Hey TD. Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. Novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment. *J Biol Chem*. 1991; 266(34):23422-23427.
- Wang P, Tumer NE. Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv Virus Res*. 2000 ;55:325-55. Review.
- Wang Y. Chemistry of trichosanthin, a new biologically active protein. In: *Advances in Chinese Medicinal Material Research*. 1985; Pp 319-326.
- Wiels J, Junqua S, Dujardin P, Le Pecq JB, Tursz T. Properties of immunotoxins against a glycolipidic antigen associated with Burkitt's lymphoma. *Cancer Res*. 1984; 44:129-133.
- Wiley RG. Targeting toxins to neural antigens and receptors. *Semin. Cancer Biol*. 1996; 7:71-77. Review.
- Wiley RG, Blessing WW, Reis DJ. Suicide transport: destruction of neurons by retrograde transport of ricin, abrin and modeccin. *Science*. 1982; 216:889-890.
- Wiley RG, Oeltman TN. Anatomically selective peripheral nerve ablation using intraneural ricin injection. *J. Neurosci. Meth*. 1986; 17:43-53.
- Wiley RG, Stirpe F. Neuronotoxicity of axonally transported toxic lectins, abrin, modeccin and volkensin in rat peripheral nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 1987; 13:39-53.

- Wiley RG, Stirpe F, Thorpe PE, Oeltmann TN. Neurotoxic effects of monoclonal anti-Thy 1 antibody (OX7) coupled to the ribosome inactivating protein saporin, as studied by suicide transport experiments in the rat. *Brain Res.* 1989; 505:44-54.
- Wiley RG, Kline IV RH. Neuronal lesioning with axonally transported toxins. *J. Neurosci. Methods.* 2000; 103:73-82. Review.
- Yamasaki N, Hatakeyama T, Funatsu G. Ricin D-saccharide interaction as studied by ultraviolet difference spectroscopy. *J. Biochem.* 1985; 98:1555-1560.
- Yamamoto T, Iwasaki Y, Konno H. Retrograde axoplasmic transport of toxic lectins is useful for trans ganglionic tracings of peripheral nerve. *Brain Res.* 1983; 274:325-328.
- Yamamoto T, Iwasaki Y, Konno H. Experimental sensory gangliectomy by way of suicide axoplasmic transport. *J. Neurosurg.* 1984; 60:108-114.
- Yamamoto T, Iwasaki Y, Konno H, Kudo H. Primary degeneration of motor neurons by toxic lectins conveyed from the peripheral nerve. *J. Neurol. Sci.* 1985; 70:327-337. Review.
- Yeung HW, Li WW, Feng Z, Barbieri L, Stirpe F. Trichosanthin, alpha-momorcharin and beta-momorcharin: identity of abortifacient and ribosome-inactivating proteins. *Int J Pept Protein Res.* 1988; 31(3):265-268.
- Zamboni MC, Brigotti M, Rambelli F, Montanaro L, Sperti S. High-pressure-liquid-chromatographic and fluorimetric methods for the determination of adenine released from ribosomes by ricin and gelonin. *Biochem. J.* 1989; 259:639-643.
- Zhang C, Gong Y, Ma H, An C, Chen D, Chen ZL. Reactive oxygen species involved in trichosanthin-induced apoptosis of human choriocarcinoma cells. *Biochem J.* 2001; 355(Pt 3):653-661.
- Zhang F, Sun S, Feng D, Zhao WL, Sui SF. A novel strategy for the invasive toxin: hijacking exosome-mediated intercellular trafficking. *Traffic.* 2009; 10(4):411-424.
- Zheng YT, Zhang WF, Ben KL, Wang JH. In vitro immunotoxicity and cytotoxicity of trichosanthin against human normal immunocytes and leukemia-lymphoma cells. *Immunopharmacol-Immunotoxicol.* 1995; 17(1):69-79.
- Zheng S, Li WW, Yeung HW, Wu AA. Kinetics of IgE antibody response to trichosanthin a-momorcharin and b-momorcharin in mice. *Chin. Med. J.* 1991; 104:292-299.